

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2003.10.07	(73) Titular(es): SYNGENTA PARTICIPATIONS AG SCHWARZWALDALLEE 215 4058 BASEL CH
(30) Prioridade(s): 2002.10.15 US 418596 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.07.20	(72) Inventor(es): ERIC BOUDREAU US WEINING GU US ANIC DE FRAMOND US PETER HEIFETZ US
(45) Data e BPI da concessão: 2012.01.25 084/2012	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **DISPOSITIVO DE INJEÇÃO ELETRÓNICO PORTÁTIL PARA A INJEÇÃO DE MEDICAÇÃO LÍQUIDA**

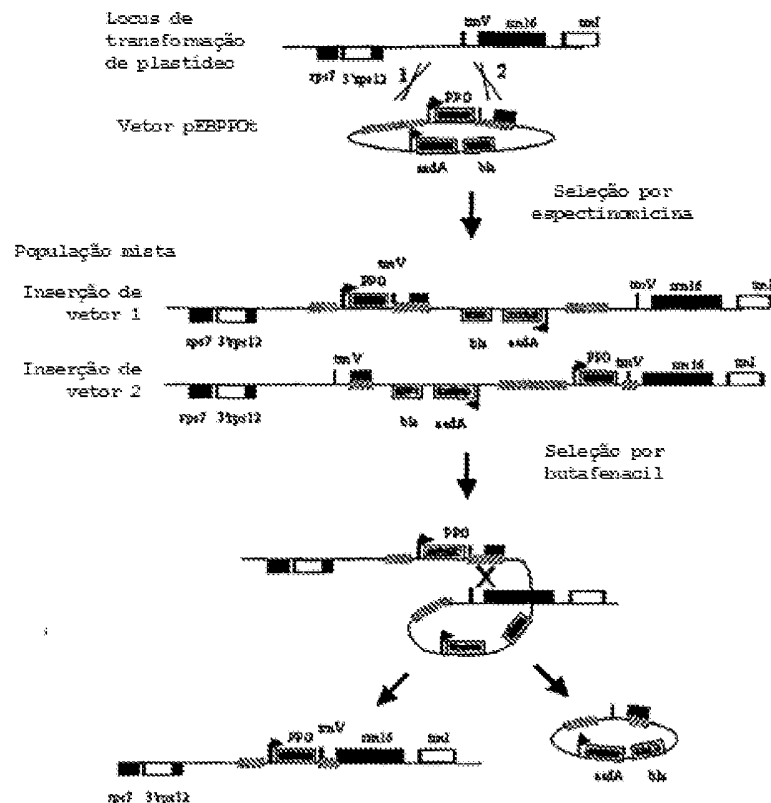
(57) Resumo:

É DESCRITO UM DISPOSITIVO DE ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAÇÃO COMPREENDENDO UMA ESTRUTURA DE ACONDICIONAMENTO, UMA PORTA (88) QUE, NA SUA POSIÇÃO ABERTA, PERMITE A INSERÇÃO/REMOÇÃO DE UM RECIPIENTE DE MEDICAÇÃO (83) PARA O INTERIOR/A PARTIR DA REFERIDA ESTRUTURA DE ACONDICIONAMENTO, UM MECANISMO DE ABERTURA DA PORTA (89, 123, 125, 126, 82) PARA A ABERTURA/FECHO DA REFERIDA PORTA (88), E UM MEMBRO DE PRESSÃO, QUE PODE SER MOVIDO AXIALMENTE A PARTIR DE UMA POSIÇÃO RETRAÍDA, ESTANDO LOCALIZADO FORA DO REFERIDO RECIPIENTE DE MEDICAÇÃO (83), PARA INTRODUIR O REFERIDO RECIPIENTE DE MEDICAÇÃO (83) E EMPURRAR O MEDICAMENTO LÍQUIDO CONTIDO NO REFERIDO RECIPIENTE DE MEDICAÇÃO (83) PARA FORA DO REFERIDO RECIPIENTE DE MEDICAÇÃO (83) PARA ADMINISTRÁ-LO A UM PACIENTE, E O QUAL DEPOIS REGRESSA À SUA POSIÇÃO RETRAÍDA, CARACTERIZADO POR COMPREENDER UM MECANISMO DE BLOQUEIO (94, 129) PARA BLOQUEAR PELO MENOS PARTE DO REFERIDO MECANISMO DE ABERTURA DE PORTA (89, 123, 125, 126, 82), PARA EVITAR A ABERTURA DA REFERIDA PORTA (88), QUANDO O REFERIDO MEMBRO DE PRESSÃO SE ENCONTRA NO INTERIOR DO REFERIDO RECIPIENTE DE MEDICAÇÃO (83) E PARA DESBLOQUEAR O REFERIDO MECANISMO DE ABERTURA DE PORTA (89, 123, 125, 126, 82) QUANDO O REFERIDO MEMBRO DE PRESSÃO SE ENCONTRA NA SUA POSIÇÃO RETRAÍDA.

RESUMO

"TRANSFORMAÇÃO DE PLASTÍDEOS"

A presente invenção refere-se ao campo da transformação de plastídeos. A invenção fornece vetores e métodos de transformação para a obtenção de plantas ou algas transplastômicas, contendo um plastídeo transformado, compreendendo os passos de introdução de uma molécula ou vetor de ácidos nucleicos recombinante em plastídeos e duas fases de seleção, com a primeira fase de seleção usando um composto não letal e uma segunda fase de seleção usando um composto letal. Alternativamente, o método de seleção dupla é conduzido simultaneamente, usando uma concentração mais baixa do composto letal.



DESCRIÇÃO
"TRANSFORMAÇÃO DE PLASTÍDEOS"

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se ao campo da transformação de plastídeos. A invenção fornece vetores de transformação e métodos para a obtenção de plantas ou algas transplastômicas contendo um plastídeo transformado, compreendendo os passos de introdução de uma molécula ou vetor de ácidos nucleicos recombinante nos plastídeos, e duas fases de seleção, com a primeira fase de seleção usando um composto não letal e uma segunda fase de seleção usando um composto letal. Alternativamente, o método de seleção dupla é conduzido simultaneamente, usando uma concentração mais baixa do composto letal.

Antecedentes da Invenção

O aperfeiçoamento de variedades de plantas através da transformação tornou-se cada vez mais importante para o melhoramento moderno de plantas. Várias tecnologias de transferência de genes permitem a incorporação de moléculas de ADN estranho nos genomas das plantas. A expressão de genes codificados por estas moléculas de ADN estranhas (transgenes, genes de interesse), pode potencialmente conferir novas características vantajosas à planta, como por exemplo, melhor qualidade ou rendimento da cultura. A expressão de transgenes também pode permitir a utilização das plantas como fábricas bio-orgânicas.

A maioria dos sistemas de transferência de genes, tais como transformação mediada por *Agrobacterium*, ou bombardeamento com partículas revestidas com ADN, integra de forma estável genes heterólogos no genoma nuclear da planta, por

intermédio de recombinação não homóloga. A engenharia de plantas que faz uso destes métodos apresenta várias desvantagens. Estes métodos produzem uma população de transformantes que varia no número de cópias de transgene, e cuja expressão é frequentemente imprevisível devido a variações no efeito de posição, ou eventual silenciamento de genes. A maioria das plantas transgénicas produzidas através destes métodos contém, no seu genoma nuclear, sequências de vetores não desejadas associadas com o gene de interesse. Além disso, a ameaça de contaminação por transgenes de plantas semelhantes selvagens, a partir de plantas modificadas geneticamente, é uma grande preocupação ambiental. O risco de libertação de transgenes de culturas geneticamente modificadas para plantas semelhantes selvagens ocorre predominantemente através de disseminação de pólenes.

A transformação genética de plastídeos é uma alternativa importante para a expressão de genes heterólogos em plantas (revisto por Bogorad, Trends Biotechnol. 18: 257-263, 2000 e Bock, J. Mol. Biol. 312: 425-438, 2001). Apesar dos genomas de plastídeos serem relativamente pequenos em tamanho, 120 a 160 kb, eles podem facilmente acomodar em si vários quilobases de ADN estranho. A inserção de ADN estranho no genoma do plastídeo pode ocorrer através de recombinação homóloga e um transgene pode ser dirigido a um locus em particular, usando regiões de flanqueamento homólogas adequadas. Uma das principais vantagens de transformação de plastídeos é que é possível obter níveis de expressão de transgene muito elevados. O genoma do plastídeo (plastoma) é altamente poliploide, e assim o transgene é expresso a partir de múltiplas cópias no plastídeo. A poliploidia do genoma do plastídeo é tal, que uma célula de uma folha madura pode conter mais de 10.000

cópias do plastoma. O que também contribui para o elevado nível de expressão de transgenes pelos plastídeos é a ausência de efeito de posição e silenciamento de genes. Outra grande vantagem é que os plastídeos são apenas herdados parentalmente e por isso, o risco ecológico de libertação de transgenes de plastídeos através de cruzamento mediado por pólenes é minimizado. As técnicas básicas de transferência de ADN para transformação de plastídeos são à base de bombardeamento de partículas nas folhas ou absorção de ADN pelos protoplastos mediada através de polietilenoglicol. A transformação de plastídeos através de biolística foi inicialmente conseguida na alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton et al., Science 240: 1534-1537, 1988), e esta estratégia fazendo uso da seleção de loci de resistência a antibióticos com atuação em cis (resistência a estreptomicina / estreptomicina), ou complementação de fenótipos mutantes não fotossintéticos, foi alargada a *Nicotiana tabacum* (Svab et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8526-8530, 1990), *Arabidopsis* (Sikdar et al., Plant Cell Reports 18: 20-24, 1991), *Brassica napus* (WO 00/39313), batata (Sidorov et al., The Plant Journal 19(2): 209-216, 1999), petúnia (WO 00/28014), tomate (Ruf et al., Nature Biotechnology 19: 870-875, 2001), colza (Hou et al., Transgenic Res. 12: 111-114, 2003) e *Lesquerella Fendleri* (Skarjinskaia et al., Transgenic Res. 12: 115-122, 2003). A transformação de plastídeos de Tabaco e do musgo *Physcomitrella patens* foi conseguida com a utilização de absorção de ADN mediada por polietilenoglicol (PEG) (O'Neill et al., Plant J. 3: 729-738, 1993; Koop et al., Planta 199: 193-201, 1996). Mais recentemente, a microinjeção de ADN diretamente em plastídeos de células de mesófilo marginal de planta do tabaco intacta resultou na expressão transitória (Knoblauch et al., Nature Biotechnology 17: 906-909, 1999), mas ainda

não foram descritos transformantes estáveis usando esta técnica. A transformação estável de cloroplastos por biolística também foi descrita para a euglenófito *Eugena gracilis* (Doetsch et al., Curr Genet. 39: 49-60, 2001) e para a alga vermelha unicelular *Porphyridium* sp. (Lapidot et al., Plant Physiol. 129: 7-12, 2002), sendo que o marcador de seleção dominante usado para a última consiste numa forma mutante do gene que codifica a acetohidroxiácido sintase, o qual confere tolerância ao herbicida sulfometuron metil. Como previamente mencionado, a transformação de cloroplastos consiste na integração de ADN estranho numa posição específica no genoma do plastídeo, através de recombinação homóloga. Os vetores de transformação de plastídeos consistem em ADN de plastídeo clonado, homólogo à região alvo, o qual flanqueia um gene marcador de seleção o qual está, por sua vez, ligado a um ou vários genes de interesse. Após a transformação, o ou os transgenes e o marcador de seleção são inseridos juntos como um bloco de sequência heteróloga no locus alvo do genoma de plastídeo, através de recombinação homóloga entre a sequência de plastídeo do vetor e o locus alvo. Para obter plantas homoplásmicas transformadas de forma estável, ou seja, plantas com o ADN estranho inserido em todas as cópias de plastoma da célula vegetal, são necessárias várias rondas de subcultura em meio seletivo. Este processo facilita a segregação de plastídeos transplastômicos e não transformados, e resulta na seleção de células homoplásmicas com gene ou genes de interesse e o marcador de seleção, integrados de forma estável no plastoma, uma vez que estes genes se encontram ligados.

A transformação de plastídeos mais estável demonstrada até hoje teve como base a seleção usando o gene de resistência a antibiótico *aadA* (tal como referido anteriormente) ou

NPTII (Carrer et al., Mol Gen Genet 241: 49-56, 1993), para obter plantas homoplásmicas. A eficiência de transformação pode ser aumentada substancialmente pela utilização de um gene *aadA* quimérico, o qual confere resistência contra espectinomicina e estreptomicina (Svab e Maliga, Proc. Natl. Sci. USA (1993) 90: 913-917). Estes marcadores de seleção conferem um fenótipo de seleção específico, a pigmentação verde (US 5,451,513), a qual permite a distinção visual das células transplastômicas pigmentadas verdes, de células contendo plastídeos tipo-selvagem, os quais não são pigmentados nas condições de seleção.

A maioria dos métodos de transformação de plastídeos depende da utilização de um marcador de seleção que confere uma seleção não letal. Estes marcadores de seleção também conferem um fenótipo de seleção específico, a pigmentação verde (US Patent No. 5,451,513), a qual permite a distinção visual das células transplastômicas pigmentadas verdes de células contendo plastídeos tipo selvagem, as quais não são pigmentadas, em condições de seleção. Por exemplo, plantas transformadas com o gene bacteriano *aadA*, o qual confere resistência a espectinomicina e estreptomicina, crescem normalmente na presença de qualquer um destes antibióticos, ao passo que plantas não transformadas vão desaparecendo. As plantas transformadas podem, por isso, ser facilmente identificadas usando clorofila como marcador visual. Existe um número limitado de marcadores de seleção disponíveis para transformação de plastídeos e os mais fidedignos, tais como *aadA* ou mutações pontuais no ADNr 16S e genes *rps 12* do plastídeo, conferem resistência aos mesmos antibióticos, espectinomicina e/ou estreptomicina. Observou-se que os marcadores de seleção que conferem resistência a outros antibióticos, tais como a canamicina, são muito menos eficazes para a transformação de plastídeos.

Tem havido preocupações relativamente a genes de resistência a antibióticos em culturas geneticamente modificadas (GM), devido aos riscos potenciais de transferência genética horizontal para microrganismos no ambiente e micróbios intestinais. Estes riscos potenciais podem constituir preocupações ainda maiores com plantas transplastômicas, devido às características procariotas do genoma dos plastídeos e número muito mais elevado de cópias de transgene por célula. É por isso altamente desejável obter plantas transplastômicas sem genes de resistência a antibióticos.

Outras alternativas são métodos em que o gene de resistência a antibióticos é removido após a transformação. Logo que as plantas sejam homoplásmicas para o transgene, a presença do gene do marcador de seleção no plastoma já não é necessária. A remoção do marcador de seleção de uma planta transplastômica foi conseguida através de dois métodos diferentes. O primeiro método, inicialmente desenvolvido para reciclar o marcador de seleção de um plastoma transformado de *C. reinhardtii* (Fischer et al., Mol. Gen. Genet. 251: 373-80, 1996) e recentemente alargado a *Nicotiana tabacum* (Iamtham e Day, Nat. Biotechnol. 18: 1172-1176, 2000), tem como base o sistema de recombinação homóloga de plastídeos para eliminar o gene marcador do genoma do plastídeo. A recombinação homóloga entre sequências repetidas diretas a flanquear o marcador de seleção resulta na deleção do segmento de ADN. Este método requer várias rondas de autocruzamento e retrocruzamento antes de se obter plantas transgênicas sem marcador de seleção. O segundo método usa o sistema de recombinação Cre/lox (Hajdukiewicz et al., The Plant J. 27: 161-170, 2001; Comeille et al., The Plant J. 27: 171-179, 2001),

para remover o segmento de ADN. Neste método, a proteína Cre medeia a excisão de um segmento de ADN localizado entre dois locais lox em orientação de repetição direta. Para remover o marcador de seleção, o gene Cre é introduzido no núcleo das plantas transplastômicas através de transformação nuclear ou através de cruzamento. Logo que o gene do marcador de seleção seja removido, o gene Cre é eliminado por cruzamento genético. Apesar do sucesso, a remoção do marcador de seleção usando qualquer um destes métodos apresenta algumas desvantagens. Ambos os métodos são processos demorados, uma vez que podem ser necessárias várias rondas de cruzamento, e ambos os métodos deixam um segmento de ADN heterólogo no genoma do plastídeo que não tem qualquer função. Além disso, foi observada recombinação não específica que causa deleções de ADN com o sistema de recombinação Cre/lox (Hajdukiewicz et al., 2001). Assim, existe uma necessidade de desenvolver outros métodos para obter plantas transplastômicas sem a integração estável de um marcador de seleção para antibióticos no genoma do plastídeo.

A aplicação de genes de resistência a antibióticos como marcadores de seleção para a transformação de plastídeos também é limitada pela necessidade da pigmentação verde como fenótipo de seleção. Uma seleção com base em pigmentação verde precisa de ser executada com luz, o que pode não ser as condições ótimas de cultura para algumas culturas de células vegetais. Além disso, nem todos os tipos de tecido exibem o fenótipo de pigmentação verde em condições de cultura normais, como por exemplo, a maioria das culturas de células de cereais. É por isso desejável desenvolver uma estratégia de seleção para transformação de plastídeos na qual a seleção não seja dependente da pigmentação verde.

Certos genes de marcadores que não conferem resistência a antibióticos, como por exemplo o gene da protoporfirinogênio oxidase (US 6,084,155), os genes da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (Daniell et al., Nature Biotech 16: 345-348, 1998; Ye et al., The Plant Journal 25(3): 261-270, 2001), e o gene *bar* (Lutz et al., Plant Physiology 125: 1585-1590, 2001) podem ser expressos eficazmente em plantas transplastômicas. Mais recentemente, EPSPS e o gene *bar* também foram usados em estratégias de segregação para obtenção de plantas transplastômicas resistentes a herbicidas, com exclusão de gene de antibiótico (Ye et al., Plant Physiology 133: 402-410, 2003).

Outra alternativa é a utilização de betaína aldeído desidrogenase de espinafre como marcador de seleção, que confere resistência ao composto letal betaína aldeído (Daniell et al., Curr Genet 2001 39: 109-116, 2001). A US2002/0042934 divulga um método de seleção em duas fases, para a obtenção de plantas transplastômicas, através da utilização de um marcador letal e um não letal, em que os dois marcadores estão localizados em plasmídeos separados. Este método tem a desvantagem de uma eficiência bastante baixa, resultante de taxas de co-transformação baixas. A presente invenção fornece métodos para transformação de plastídeos numa grande variedade de plantas e algas. Ela foca o problema da remoção do marcador de resistência a antibióticos, o qual é introduzido nos plastídeos durante a transformação e fornece métodos de seleção para plantas transplastômicas homoplásmicas, em que pigmentação verde do fenótipo selecionado não é um pré-requisito.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1: Mapa do vetor de transformação de plastídeos pEBPPot (SEQ ID NO: 1). As sequências alvo de plastídeo pIDNA 16rDNA e rps 12/7 são representadas pelas linhas tracejadas. Os componentes do gene ppo quimérico de *A. thaliana* são o promotor do gene 16S PEP-NEP rRNA de plastídeo de milho ligado ao rbcL RBS de plastídeo de *N. tabacum* (SEQ ID NO:4; PmrrN), o gene ppo de *A. thaliana* (Atpo) e a 3'UTR de rps 16 (3'rps16) de plastídeo de *N. tabacum*. Os componentes do gene aadA quimérico são o promotor de psbA de *N. tabacum* (PpsbA) ligado a aadA, sequência codificante de aadA (aadA) e a 3'UTR de psbA (3'psbA) de *A. thaliana*. A resistência a ampicilina na sequência do esqueleto do vetor (amp) é codificada pelo gene bla e indicada por uma seta. Os locais de restrição são marcados para: PstI, NdeI, EcoRI, EcoRV, BamHI e ScaI.

Figura 2: Mapa do vetor de transformação de plastídeos pEB8 (SEQ ID NO:2). As sequências alvo de plastídeo pIDNA 16rDNA e rps 12/7 são representadas pelas linhas tracejadas. Os componentes do gene ppo quimérico de *A. thaliana* são o promotor de psbA (PpsbA) de *N. tabacum*, o gene ppo de *A. thaliana* (Atpo) e 3'UTR de rps 16 (3'rps16) de plastídeo de *N. tabacum*. Os componentes do gene aadA quimérico são o promotor de plastídeo de cIpP (PcIpP) de *N. tabacum*, a sequência codificante de aadA (aadA) e a 3'UTR de rps 16 (3'rps16) de plastídeo de *N. tabacum*. A resistência a ampicilina na sequência do esqueleto do vetor (amp) é codificada pelo gene bla e indicada por uma seta. Os locais de restrição são marcados para: PstI, NdeI, EcoRI, EcoRV, BamHI e ScaI.

Figura 3: Mapa do vetor de transformação de plastídeos pNY2C (SEQ ID NO:3). As sequências alvo 1 de plastídeo (número de acesso NC_001879 posição 96811 a 97844), 2

(posição 95356 a 96811) e 3 (posição 93132 a 95351) para recombinação homóloga estão sublinhadas. O gene *aadA* quimérico é inserido no gene essencial *yzf2* na posição 95351 do genoma de plastídeo do tabaco. O gene *ppo* quimérico de *A. thaliana* é inserido na região intergênica entre os genes de plastídeo *ndhB* e *trnL*, na posição 96811 do genoma do plastídeo do tabaco. Os componentes do gene *ppo* quimérico de *A. thaliana* são o promotor do gene 16S PEP-NEP rRNA de plastídeo de milho ligado ao *rbcL* RBS de plastídeo de *N. tabacum* (*PmrrN*), o gene *ppo* de *A. thaliana* (*Atppo*) e a 3'UTR de *rps 16* (3'*rps16*) de plastídeo de *N. tabacum*. Os componentes do gene *aadA* quimérico são o promotor de *psbA* de *N. tabacum* (*PpsbA*) ligado a *aadA*, sequência codificante de *aadA* (*aadA*) e a 3'UTR de *psbA* (3'*psbA*) de *A. thaliana*. Os locais de restrição são marcados para: *EcoRI*, *EcoRV*, *MluI*, *NcoI*, *NdeI*, *NgoMIV*, *ScaI*, *SnaBI*, *SpeI*, *XbaI* e *XhoI*.

Figura 4. Ilustra um esquema para a integração do transgene PPO num genoma de plastídeo. Após seleção inicial com espectinomicina, o vetor completo integra o genoma do plastídeo via dois eventos de recombinação possíveis, que ocorrem entre as sequências flanqueadoras do vetor *rps12* (1) ou *tmV-rrn16* (2) do cloroplasto, e o locus alvo do plastídeo. Estes eventos de cruzamentos simples originam uma população de genomas transformados de plastídeo, com o vetor inserido em diferente conformação. Seguidamente, a seleção por butafenacil permite um segundo evento de recombinação entre sequências repetidas diretas, que resulta em integração estável do gene PPO no genoma do plastídeo e na excisão completa de *aadA* com a sequência do esqueleto do vetor. Apenas um de dois eventos de intra-recombinação possíveis é apresentado no presente exemplo. A

continuação da seleção por butafenacil permite a seleção homoplásmica para genomas de plastídeo contendo o gene PPO.

Figura 5. Exemplos de análise de hibridização de Southern para identificar transformantes de plastídeos homoplásmicos. A) Polimorfismos de comprimento de BamHI esperados entre o locus de transformação tipo-selvagem, plastídeos transformados com PPO e integração do vetor completa após evento único de recombinação de cruzamento entre as sequências flanqueadoras *rps12* (1) ou as sequências flanqueadoras *trnV-rrn16* (2). B indica a posição dos locais de restrição de BamHI. B) Paineis superior e inferior; hibridização Southern de ADN total digerido com BamHI de tipo-selvagem (coluna wt) e 10 transformantes (colunas marcadas de 1 a 10), e hibridizado com a sonda específica para o locus de inserção. A sequência tipo selvagem de plastídeo é observada a 3,2 kb, sequência de linhas transformadas com PPO homoplásmicas (colunas 1-3, 5-7 e 10), a 5,0 kb. A linha heteroplásmica (colunas 4 e 9) contém as sequências de PPO inserido e tipo-selvagem. Paineis superior e inferior; hibridização Southern de ADN total digerido com SpeI de tipo-selvagem (coluna wt) e 10 transformantes (colunas marcadas de 1 a 10), e hibridizado com sonda específica para o gene *aadA*. O gene *aadA* (0,9 kb) é apenas observado nas linhas heteroplásmicas (colunas 4 e 9).

Figura 6. Ilustra um esquema para a integração do transgene PPO num genoma de plastídeo. Após seleção inicial com espectinomicina, os marcadores de seleção integram o genoma de plastídeo via 3 eventos possíveis de recombinação por cruzamento duplo, que ocorrem entre o vetor de transformação de plastídeo e o locus alvo do plastídeo. Isto origina uma população mista de genomas de plastídeo

transformados contendo um ou ambos os marcadores de seleção. Seguidamente, a seleção por butafenacil permite seleção homoplásmica para genomas de plastídeo que contêm o gene PP e a excisão completa de *aadA* do gene essencial.

Figura 7. Mapa do vetor de transformação de plastídeo pEB 10. As sequências alvo de plastídeo pIDNA 16rDNA e *rps* 12/7 são representadas pelas linhas tracejadas. Os componentes do gene *ppo* quimérico de *A. thaliana* são as sequências tipo promotor de bacteriófago X2 de *Staphylococcus aureus*, ligadas a 5'UTR (PX2k10) do gene 10 de bacteriófago *kvpI*, o gene *ppo* de *A. thaliana* (*Atppo*) e 3'UTR de *rps* 16 (3'*rps*16). Os componentes do gene *aadA* quimérico são o promotor de plastídeo de *cIpP* (*PcIpP*) de *N. tabacum*, a sequência codificante de *aadA* (*aadA*) e a 3'UTR de *rps* 16 (3'*rps*16) de plastídeo de *N. tabacum*. O gene de resistência a ampicilina do vetor (*amp*) é indicado por uma seta. Os locais de restrição marcados são para: *Pst*I, *Nde*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Bam*HI e *Sca*I.

Descrição da Lista de Sequências

SEQ ID NO:1

Vetor de transformação de plastídeo pEBPPOt (Exemplo 1 VII).

SEQ ID NO:2

Vetor de transformação de plastídeo pEB8 (= pEB8a) (Exemplo 2).

SEQ ID NO:3

Vetor de transformação de plastídeo pNY2C (Exemplo 4 II).

SEQ ID NO:4

Sequência de ADN do promotor do gene 16S PEP-NEP rRNA de plastídeo de milho, ligado ao local de ligação ao ribossoma rbcL de plastídeo de *N. tabacum* (RBS).

SEQ ID NO:5

Primer da parte superior para a amplificação do promotor do gene 16S PEP-NEP rRNA a partir do ADN de plastídeo de milho; o primer compreende um local de restrição EcoRI (Exemplo 11).

SEQ ID NO:6

Primer da parte inferior, compreendendo um local de restrição BspHI (Exemplo 1 I).

SEQ ID NO:7

Primer da parte superior para a amplificação do gene ppo de *A. thaliana* (Exemplo 1 II).

SEQ ID NO:8

Primer da parte inferior para a amplificação do gene ppo de *A. thaliana*; o primer compreende um local de restrição SpeI (Exemplo 1 II).

SEQ ID NO:9

Primer da cadeia superior para amplificação do promotor do gene psbA de *N. tabacum*; o primer compreende um local de restrição EcoRI (Exemplo 1 III).

SEQ ID NO:10

Primer da cadeia inferior para amplificação do promotor do gene psbA de *N. tabacum*; o primer compreende um local de restrição NcoI (Exemplo 1 III).

SEQ ID NO:11

Primer superior para a amplificação do promotor do gene cIpP de *A. thaliana*; o primer compreende um local de restrição EcoR1 (Exemplo 1 V).

SEQ ID NO:12

Primer inferior para a amplificação do promotor do gene cIpP de *A. thaliana*; o primer compreende um local de restrição BspHI (Exemplo 1 V).

SEQ ID NO:13

Primer superior para a amplificação de um novo locus alvo de ADN de plastídeo; o primer compreende um local de restrição XhoI (Exemplo 4 I).

SEQ ID NO:14

Primer inferior para a amplificação de um novo locus alvo de ADN de plastídeo; o primer compreende um local de restrição XbaI (Exemplo 4 I).

SEQ ID NO:15

Promotor do bacteriófago X2 de *Staphylococcus aureus*

SEQ ID NO:16

5' UTR do gene 10 de bacteriófago kvp1 de *Kluyvera*

SEQ ID NO:17

3' UTR do gene 9 de bacteriófago T3

SEQ ID NO:18

Sequência de nucleótidos da sequência quimérica tipo promotor de bacteriófago X2 de *Staphylococcus*, ligada a 5' UTR do gene 10 de bacteriófago kvp1.

SEQ ID NO:19

Sequência de nucleótidos do vetor de transformação de plastídeo pEB 10.

SEQ ID NO:20

Primer da cadeia superior para a amplificação do promotor de 16S BEP-PEP (local EcoRI)

SEQ ID NO:21

Primer da cadeia inferior para a amplificação do promotor de 16S BEP-PEP (local XbaI)

SEQ ID NO:22

Cadeia superior para a amplificação de 5'UTR do gene T3 de bacteriófago (RTK36)

SEQ ID NO:23

Primer da cadeia inferior para a amplificação de 5'UTR do gene T3 de bacteriófago (RTK39)

SEQ ID NO:24

Primer da cadeia superior para a amplificação de 16S NEP-PEP de milho (local SmaI) (RTK38)

SEQ ID NO:25

Primer da cadeia inferior para a amplificação de 16S NEP-PEP de milho (local BspHI) (RTK37)

SEQ ID NO:26

Cadeia superior do fragmento EcoRI-XbaI da sequência tipo promotor de bacteriófago X2.

SEQ ID NO:27

Cadeia inferior do fragmento EcoRI-XbaI da sequência tipo promotor de bacteriófago X2.

SEQ ID NO:28

Primer da cadeia superior para 5'UTR do gene 10 de kpv1

SEQ ID NO:29

Primer da cadeia inferior para 5'UTR do gene 10 de kpv1

Definições

Para fins de clareza, certos termos usados na descrição são definidos como se segue:

"Associado com / operativamente ligado" refere-se a duas sequências de ácidos nucleicos que estão relacionados física ou funcionalmente. Por exemplo, diz-se que um promotor ou sequência de ADN regulatória está "associada com" uma sequência de ADN que codifica um ARN ou uma proteína, se as duas sequências estão operativamente ligadas, ou situadas de tal modo que a sequência de ADN regulatória irá afetar o nível de expressão da sequência de ADN codificante ou estrutural.

Uma "molécula artificial de ADN quimérica" ou um "gene quimérico" é uma sequência recombinante de ácidos nucleicos, na qual um promotor ou sequência de ácidos nucleicos regulatória está operativamente ligada a, ou associada com, uma sequência de ácidos nucleicos que codifica para um ARNm ou que é expressa como uma proteína, de tal modo que a sequência de ácidos nucleicos regulatória é capaz de regular a transcrição ou expressão da sequência de ácidos nucleicos associada. A sequência de ácidos

nucleicos regulatória da molécula artificial de ADN quimérica não está normalmente operativamente ligada à sequência de ácidos nucleicos associada, como encontrado na natureza.

Uma "sequência codificante" é uma sequência de ácidos nucleicos que é transcrita para ARN, como por exemplo ARNm, ARNr, ARNt, ARNsn, ARN sense ou ARN antisense. De preferência, a tradução do ARN ocorre num organismo para produzir uma proteína.

"Cassete de expressão" tal como aqui utilizado, significa uma molécula de ácidos nucleicos capaz de dirigir a expressão de uma dada sequência de nucleótidos numa célula hospedeira apropriada, ou compartimento de uma célula hospedeira, compreendendo um promotor operativamente ligado a sinais de terminação. Também contém, tipicamente, sequências necessárias para a tradução apropriada da sequência de nucleótidos. A região codificante geralmente codifica uma proteína de interesse, mas também pode codificar um ARN funcional de interesse, por exemplo ARN antisense ou um ARN que não sofre tradução, na direção sense ou antisense. A cassete de expressão que compreende a sequência de nucleótidos de interesse pode ser quimérica, o que significa que pelo menos um dos seus componentes é heterólogo em relação a pelo menos um dos seus outros componentes. A cassete de expressão também pode ser uma cassete que ocorre naturalmente, mas que foi obtida de uma forma recombinante, útil para a expressão heteróloga. Tipicamente, contudo, a cassete de expressão é heteróloga no que diz respeito ao hospedeiro, ou seja, a sequência de ADN da cassete de expressão não ocorre naturalmente na célula hospedeira e tem de ser introduzida na célula hospedeira, ou num antecessor da célula hospedeira, por um

evento de transformação. A expressão da sequência de nucleótidos na cassete de expressão pode ocorrer sob o controle de um promotor constitutivo ou de um promotor induzível que inicia a transcrição apenas quando a célula hospedeira é exposta a um determinado estímulo exterior.

No caso de um organismo multicelular, como por exemplo uma planta, o promotor também pode ser específico para um tecido ou órgão em particular, ou estágio de desenvolvimento.

Relativamente à transformação de plastídeos, a cassete de expressão é desenhada de tal forma que o promotor, o sinal de terminação e outras sequências regulatórias sejam funcionais nos plastídeos. O termo "gene" é amplamente utilizado para referir um qualquer segmento de ADN associado com uma função biológica. Assim, os genes incluem sequências codificantes e/ou sequências regulatórias necessárias para a sua expressão. Os genes também incluem segmentos de ADN não expressos, por exemplo, formam sequências de reconhecimento para outras proteínas. Os genes podem ser obtidos a partir de uma variedade de fontes, incluindo clonagem a partir de uma fonte de interesse, ou síntese a partir de informação de sequências conhecidas ou previstas, e pode incluir sequências desenhadas para parâmetros desejados.

Os termos "heterólogo" e "exógeno", quando usados aqui para referir sequências de ácidos nucleicos (por exemplo, uma sequência de ADN) ou um gene, referem-se a uma sequência que é originada a partir de uma fonte estranha a uma determinada célula hospedeira ou, se da mesma fonte, é modificada da sua forma original. Assim, um gene heterólogo numa célula hospedeira inclui um gene que é endógeno à célula hospedeira, mas que foi modificado através de, por exemplo, a utilização de arranjo combinatorial de ADN. Os

termos também incluem cópias múltiplas, que não ocorrem naturalmente, de uma sequência de ADN que ocorre naturalmente. Assim, os termos referem-se a um segmento de ADN que é estranho ou heterólogo à célula, ou homólogo à célula, mas numa posição no ácido nucleico da célula hospedeira na qual o elemento não é normalmente encontrado. Segmentos de ADN exógenos são expressos para produzir polipéptidos exógenos.

Uma sequência de ácido nucleico "homóloga" (por exemplo, ADN) é uma sequência de ácido nucleico (por exemplo, ADN) naturalmente associada com uma célula hospedeira na qual é introduzida.

"Homoplásmico" refere-se a plastídeos, células vegetais e plantas compreendendo apenas um único tipo uniforme de cópias de plastomas, ou seja, refere-se a plastídeos que não compreendem cópias de plastomas diferentes ou a células vegetais ou plantas que não compreendem populações de plastídeos mistas.

No contexto da presente invenção, uma molécula de ADN ou enzima "isolada", é uma molécula de ADN ou enzima que, por intervenção humana, existe fora do seu ambiente nativo e não é, por isso, um produto da natureza. Uma molécula de ADN ou enzima isolada pode existir numa forma purificada ou pode existir num ambiente não nativo como por exemplo, numa célula hospedeira transgénica.

"Ligado com" refere-se a uma primeira sequência de ácido nucleico ligada com uma segunda sequência de ácido nucleico, quando as sequências estão de tal modo arrançadas que a primeira sequência de ácido nucleico afeta a função da segunda sequência de ácido nucleico. De preferência, as

duas sequências fazem parte de uma molécula única contígua de ácido nucleico e mais preferencialmente elas são adjacentes. Por exemplo, um promotor está operativamente ligado a um ácido nucleico que codifica uma proteína, se o promotor regular ou mediar a transcrição da sequência codificante numa célula.

O termo "ácidos nucleicos" refere-se a desoxiribonucleótidos ou ribonucleótidos e polímeros dos mesmos, na forma de cadeia simples ou dupla. A menos que limitado especificamente, o termo inclui ácidos nucleicos que contêm análogos conhecidos de nucleótidos naturais, os quais têm propriedades de ligação semelhantes ao ácido nucleico de referência, e são metabolizados de forma semelhante aos nucleótidos que ocorrem naturalmente. A menos que indicado em contrário, uma determinada sequência de ácido nucleico também inclui, de forma implícita, variantes modificadas de forma conservativa da mesma (por exemplo, substituições degenerativas de codões), e sequências complementares, assim como as sequências indicadas explicitamente. Especificamente, substituições degenerativas de codões podem ser obtidas através da geração de sequências nas quais a terceira posição de um ou mais (ou todos) os codões selecionados, é substituída com resíduos de bases mistas / ou desoxiinosina (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)). Os termos "ácido nucleico" ou "sequência de ácidos nucleicos" podem também ser usados alternadamente com gene, ADNc e ARNm codificado por um gene.

"ORF" significa grelha de leitura aberta.

“Composto letal para plastídeos” refere-se a qualquer composto que afeta a viabilidade de um plastídeo de uma célula vegetal tipo selvagem. Os compostos que afetam a viabilidade de um plastídeo de uma célula vegetal tipo selvagem incluem, mas não estão limitados a, compostos que degradam rapidamente as membranas dos plastídeos, inibem as vias metabólicas dos plastídeos (tais como a biossíntese de aminoácidos aromáticos, a fotossíntese, a biossíntese de clorofila, a assimilação de amônio, etc.), compostos tóxicos, proteases, nucleases, compostos que alteram o pH da célula, etc. De preferência, o composto letal para a plastídeo degrada as membranas internas e externas de um plastídeo de uma célula vegetal tipo selvagem. Exemplos destes compostos incluem herbicidas, os quais incluem, mas não estão limitados a, glifosato, butafenacil, fosfinoctricina, norfluorazona, atrizina, glufosinato, bromoxinil e acifluorfenol.

Um perito na especialidade irá reconhecer que a capacidade dos compostos letais para plastídeos afetarem a viabilidade dos plastídeos é dependente da concentração do composto no meio, o tempo de exposição e o tipo e/ou fonte do tecido vegetal.

“Composto não letal para plastídeos” refere-se a compostos que não afetam o metabolismo de um plastídeo de uma célula vegetal, e por isso abrandam ou inibem o crescimento do plastídeo ou da célula num todo, mas não afetam a viabilidade do plastídeo ou da célula vegetal durante a fase inicial.

“Transformação de plastídeos” refere-se à transformação genética de uma célula vegetal ou planta, em que sequências de ADN estranhas são introduzidas nos plastídeos e integradas no genoma do plastídeo (plastoma).

Dois ácidos nucleicos são "recombinados" quando as sequências de cada um dos dois ácidos nucleicos são combinadas num ácido nucleico resultante. Duas sequências são "diretamente recombinadas" quando ambos os ácidos nucleicos são substratos para recombinação. Duas sequências são "indiretamente recombinadas" quando as sequências são recombinadas usando um intermediário, tal como um oligonucleótido de cruzamento. Para recombinação indireta, não mais do que uma das sequências é realmente um substrato para recombinação, e em alguns casos, nenhuma das sequências é um substrato para recombinação.

"Elementos regulatórios" refere-se a sequências envolvidas no controlo da expressão de uma sequência de nucleótido. Os elementos regulatórios compreendem um promotor operativamente ligado à sequência de nucleótidos de interesse e sinais de terminação. Também incluem sequências necessárias para a tradução correta da sequência de nucleótidos.

"Transformação" é o processo de introdução de ADN heterólogo numa célula vegetal, tecido vegetal ou planta. Células vegetais, tecidos vegetais ou plantas transformadas devem compreender não apenas o produto final de um processo de transformação, mas também a descendência transgénica dos mesmos.

"Transformado", "transgénico" e "recombinante" referem-se a um organismo hospedeiro, como por exemplo uma bactéria ou uma planta, na qual foi introduzida uma molécula de ácido nucleico heteróloga. A molécula de ácido nucleico pode ser integrada de forma estável no genoma do hospedeiro, ou a molécula de ácido nucleico pode também estar presente como molécula extracromossómica. Uma tal molécula

extracromossômica pode ser autorreplicante. Células, tecidos ou plantas transformados devem compreender não apenas o produto final de um processo de transformação, mas também a descendência transgênica dos mesmos. Um hospedeiro "não transformado", "não transgênico" ou "não recombinante" refere-se a um organismo tipo selvagem, ou seja, uma bactéria ou planta que não contém a molécula de ácido nucleico heteróloga.

"Transplastômico" refere-se a plastídeos, células vegetais e plantas compreendendo plastomas transformados.

Descrição Detalhada da Invenção

Secção I: Transformação de plastídeos com integração estável de um marcador de seleção letal, e integração transitória de um marcador de seleção não letal

A presente invenção fornece métodos para a produção de plantas transgênicas com genomas de plastídeo recombinantes, sem integração estável de um marcador de resistência a antibiótico.

Um aspecto da presente invenção fornece vetores de transformação de plastídeos, úteis para a obtenção de plastídeos transformados. Os vetores compreendem uma sequência quimérica de ácidos nucleicos para um marcador de seleção letal, que codifica uma proteína que confere tolerância a um composto letal para as células, e uma sequência quimérica de ácidos nucleicos para um marcador de resistência a um composto seletivo, não letal para plastídeos. Num vetor de acordo com a invenção, a sequência de ácidos nucleicos para um marcador de seleção letal é flanqueada por sequências alvo de plastídeo, ao passo que a

sequência de ácidos nucleicos para um marcador de seleção não letal está localizada no esqueleto do vetor, fora das sequências alvo de plastídeo. A sequência quimérica de ácidos nucleicos do marcador de seleção letal compreende uma sequência de promotor funcional no plastídeo, uma região regulatória não traduzida 5' (5'UTR), uma sequência de ADN que codifica uma proteína que confere tolerância a um composto letal para a célula, e uma região regulatória não traduzida 3' (3'UTR).

A sequência quimérica de ácidos nucleicos para o marcador de seleção não letal compreende uma sequência de promotor funcional no plastídeo, uma 5'UTR regulatória, uma sequência de ADN que codifica um marcador de seleção não letal, que codifica uma proteína que confere ao plastídeo resistência contra um composto não letal, e uma 3'UTR.

Outro aspeto da presente invenção fornece vetores de transformação de plastídeos, úteis para a obtenção de plastídeos transformados, e integração das sequências de ADN no genoma do plastídeo. Estas sequências de ADN podem, por exemplo, ser genes, sequências ou moléculas quiméricas de ácidos nucleicos, ou cassetes de expressão do produto de um gene ou produtos de um gene, nos plastídeos transformados. Estes vetores de transformação de plastídeos contêm, para além das características previamente descritas, pelo menos uma destas sequências de ADN que está ligada à sequência quimérica de ácidos nucleicos para o marcador de seleção letal, dentro de sequências alvo de plastídeos. Uma vez que sequências de ADN a expressar compreendem tipicamente uma sequência de promotor funcional nos plastídeos, uma 5'UTR regulatória, pelo menos um segmento de ADN que codifica um produto do gene de interesse, e uma 3'UTR. Em alternativa, a sequência de ADN

que codifica um ou vários produtos de genes e o marcador de seleção quimérico, pode ser expressa a partir de um promotor simples num gene policistrónico tipo operação.

Vários métodos conhecidos do perito na especialidade são usados para construir as moléculas artificiais de ADN e vetores da presente invenção, como por exemplo, mas não limitado a, ligação, digestões com enzimas de restrição, reação em cadeia da polimerase (PCR), mutagénese in vitro, adições de elementos de ligação e adaptadores, etc., e são descritos, por exemplo, em Sambrook et al., Molecular Cloning: a laboratory manual, 2^a edição (1989). Assim, podem ser realizadas transições, transversões, inserções, deleções de nucleótidos nas moléculas de ácido nucleico que são utilizadas nas regiões regulatórias, as sequências de ácidos nucleicos de interesse para expressão nos plastídeos.

A presente invenção também fornece métodos para a transformação de plastídeos, usando um protocolo de seleção em dois passos, com compostos não letais para os plastídeos e compostos letais para as células. Os plastídeos transformantes iniciais são selecionados num meio contendo um composto não letal para os plastídeos. A seleção é facilitada pela expressão de um gene de marcador de seleção não letal integrado de forma transitória no genoma do plastídeo. Uma vez acumulado um número suficiente de plastídeos transformados por célula, o meio com o composto não letal é substituído por um meio contendo um composto letal para as células, que seleciona genomas de plastídeo que expressam a proteína que confere tolerância a este composto.

Em alternativa, os transformantes iniciais são selecionados num meio contendo um composto não letal para plastídeos e um composto letal para as células. Uma vez acumulado um

número suficiente de plastídeos transformados por célula, a seleção continua em meio contendo apenas o composto letal para as células.

Numa forma de realização preferida da invenção, o composto não letal para plastídeos é um antibiótico, e o marcador não letal é um gene de resistência a antibiótico.

Numa outra forma de realização preferida, o composto letal para as células é um herbicida, preferencialmente um herbicida do grupo dos inibidores de PPO.

Transformação de plastídeos com integração estável de *ppo* e integração transitória de *aadA*

Numa forma de realização preferida da presente invenção, o gene do marcador de seleção letal é uma protoporfirinogênio oxidase (*ppo*), que confere tolerância ao composto letal para as células butafenacil e o gene do marcador de seleção não letal é aminoglicosídeo adeniltransferase (*aadA*), que confere resistência ao composto não letal para plasmídeos espectinomicina.

A presente invenção fornece um método para a produção de uma planta transgênica contendo genomas de plastídeos recombinantes, sem integração estável de um marcador de seleção para antibiótico, como por exemplo, *aadA*. Os plastídeos transformantes iniciais são selecionados em meio contendo espectinomicina, com base na expressão do gene *aadA*, o qual é integrado de forma transitória no genoma do plastídeo. Uma vez acumulado um número suficiente de plastídeos transformados por célula, a tolerância ao butafenacil é conferida à célula através da expressão do gene *ppo*, o qual está integrado de forma estável no

plastoma. A remoção do gene de resistência a antibiótico e a segregação e seleção de transformantes homoplásmicos é atingida mudando a seleção por espectinomicina para a seleção por butafenacil.

Também útil é um método para integrar de forma estável um ou mais transgenes de interesse num genoma de plastídeo, dirigindo-os para uma região não essencial do genoma do plastídeo, em que um marcador de seleção é inserido instavelmente no genoma do plastídeo, dirigindo-o para o genoma do plastídeo de tal modo que ele vá interromper um gene essencial do plastídeo. Este método baseia-se no facto de que a disrupção dirigida de genes essenciais do plastídeo é instável, porque os genes interrompidos reverterem para a sua conformação tipo selvagem quando a pressão seletiva é removida. Os genomas de plastídeo possuem vários genes (como por exemplo *ycf1*, *ycf2* e *cI_PP*), que são essenciais para a sobrevivência da célula. Tentativas anteriores de inativação destes genes por disrupção dirigida com genes de marcadores de seleção (Shikanai et al., *Plant Cell Physiol* 42: 264-73, 2001; Drescher et al., *Plant J.* 22: 97-104, 2000; Boudreau et al., *Mol. Gen. Genet.* 253: 649-53, 1997; Huang et al., *Mol. Gen. Genet.* 244: 151-9, 1994) resultaram apenas em populações heteroplásmicas de plastídeos, compreendendo os genes interrompidos assim como os genes tipo selvagem. A inserção do marcador de seleção nestes genes é instável e a remoção da pressão seletiva resulta na perda do marcador de seleção e na reversão para populações homoplásmicas de plastídeos, contendo apenas cópias tipo selvagem do gene essencial (Drescher et al., *Plant J.* 22: 97-104, 2000; Fischer et al., *Mol. Gen. Genet.* 251: 373-80, 1996).

Também são divulgados vetores de transformação de plastídeos úteis para a obtenção de plastídeos transformados. O vetor de transformação de plastídeos compreende um segmento de ADN homólogo a um locus do plastídeo, contendo pelo menos uma parte de uma sequência de um gene essencial de plastídeo e uma sequência não essencial de plastídeo adjacente, como por exemplo, uma região intergênica. Os vetores compreendem um gene de um marcador de seleção não letal quimérico, que codifica uma proteína, a qual confere resistência ao composto não letal para o plastídeo, em que o gene de marcador de seleção não letal é inserido na sequência do gene essencial do plastídeo. O vetor compreende ainda um gene de um marcador de seleção letal quimérico, que codifica uma proteína que confere tolerância a um composto letal para a célula, em que o gene do marcador de seleção letal é inserido na sequência não essencial do plastídeo. O gene do marcador de seleção letal quimérico compreende uma sequência de promotor funcional no plastídeo, uma 5'UTR regulatória, uma sequência de ADN que codifica uma proteína que confere tolerância a um composto letal para a célula e uma 3'UTR de plastídeo.

O gene do marcador de seleção não letal quimérico compreende uma sequência de promotor funcional no plastídeo, uma 5'UTR regulatória, uma sequência de ADN que codifica uma proteína que confere resistência a um composto não letal para plastídeos e uma 3'UTR. Ambas as cassetes dos marcadores de seleção letal e não letal são flanqueadas por uma sequência de ADN de plastídeo para inserção dirigida no genoma do plastídeo, através de recombinação homóloga. As sequências de ADN de plastídeo que ligam os genes que serão inseridos têm de ser suficientemente longas para permitir a recombinação ligada e não ligada dos genes

no genoma do plastídeo. Preferencialmente, estas sequências de ligação de plastídeo têm, pelo menos, 200 bp de comprimento.

Outro aspeto da presente invenção fornece vetores de transformação de plastídeos, úteis para a obtenção de plastídeos transformados e para a expressão de um produto de um gene, ou produtos de um gene nos plastídeos transformados. Os vetores de transformação de plastídeos compreendem, para além dos segmentos alvo de plastídeos com genes de marcadores de seleção previamente descritos, pelo menos uma sequência de ADN a expressar, que está ligada ao gene do marcador de seleção letal quimérico, na sequência não essencial. A sequência de ADN a expressar compreende uma sequência de promotor funcional no plastídeo, uma 5'UTR regulatória, um segmento de ADN que codifica um produto e uma 3'UTR de plastídeo.

Em alternativa, a sequência de ADN que codifica um ou vários produtos de um gene e o marcador de seleção letal quimérico, são expressos a partir de um único promotor, num gene policistrónico tipo operação.

A presente invenção também fornece métodos para a transformação de plastídeos, usando um protocolo de seleção em dois passos, com compostos não letais para plastídeos e letais para as células. Os plastídeos transformantes iniciais são selecionados num meio contendo um composto não letal para plastídeo. A seleção é facilitada pela expressão de um gene de um marcador de seleção não letal, integrado no gene essencial do plastídeo alvo. Uma vez acumulado um número suficiente de plastídeos transformados por célula, o meio com o composto não letal é substituído por um meio contendo um composto letal para a célula, que seleciona

genomas de plastídeos que expressam a proteína que confere tolerância a este composto. Após várias rondas de subcultura de tecido em meio seletivo letal, os genomas de plastídeo tornam-se homoplásmicos para o gene do marcador de seleção letal ou o marcador de seleção letal com sequência ou sequências de ADN a expressar, e tipo selvagem para o gene essencial alvo.

Alternativamente, os transformantes iniciais são selecionados num meio contendo um composto não letal para plastídeo e um composto letal para a célula. Uma vez acumulado um número suficiente de plastídeos transformados por célula, a seleção continua num meio contendo apenas o composto letal para a célula.

Transformação de plastídeos com integração estável de *ppo* e integração instável de *aadA*

Numa forma de realização preferida da presente invenção, o gene do marcador de seleção letal é protoporfirinogénio oxidase (*ppo*), que confere tolerância ao composto letal para a célula butafenacil, e o gene do marcador de seleção não letal é aminoglicosídeo adeniltransferase (*aadA*), que confere resistência ao composto não letal para plastídeo, espectinomicina. Também divulgado é um método para a produção de uma planta transgénica com genomas de plastídeo recombinantes, sem integração estável de um marcador de seleção para antibiótico, como por exemplo, *aadA*. Os plastídeos transformantes iniciais são selecionados em meio contendo espectinomicina, com base na expressão do gene *aadA* o qual está integrado instavelmente no genoma do plastídeo, interrompendo um gene essencial do plastídeo. Uma vez acumulado um número suficiente de plastídeos transformados por célula, a tolerância a butafenacil é conferida à célula através da expressão do gene *ppo*, o qual

é integrado de forma estável no plastoma. A reversão do gene essencial de plastídeo para o gene tipo selvagem, e a segregação e seleção de transformantes homoplásmicos é atingida substituindo a seleção por espectinomicina, por seleção por butafenacil.

Secção II: Métodos para a seleção de plantas transplastômicas com expressão do gene *ppo* nos seus plastídeos

A invenção refere-se a métodos para a seleção de células vegetais ou plantas homoplásmicas, compreendendo plastídeos transplastômicos contendo o gene *ppo* integrado nos seus plastomas, com a exclusão de um qualquer gene de resistência a antibióticos.

Estes métodos empregam uma cassete de expressão em plastídeo *ppo*, a qual é flanqueada por uma sequência homóloga ao ADN do plastídeo, uma cassete de expressão em plastídeo *aadA*, a qual está separada da sequência flanqueadora da cassete *ppo*, e qualquer uma das estratégias de seleção em uma ou duas fases fornecidas pela invenção, as quais compreendem a utilização do gene *ppo* como gene do marcador de seleção durante a fase de segregação das populações de plastídeo heteroplásmicas, e a seleção de células vegetais homoplásmicas para obtenção de plantas transplastômicas com o gene *ppo* integrado nos seus plastomas, com a exclusão do gene de resistência a antibiótico *aadA*.

Um outro aspeto da presente invenção refere-se à extensão dos métodos de transformação de plastídeos a matéria vegetal não pigmentada. A invenção fornece estratégias de seleção compreendendo a utilização de um gene marcador de seleção letal para a transformação de plastídeos e um composto letal para a célula, como por exemplo, Fórmula XVII como agente de seleção, em que a pigmentação verde não

é essencial para o fenótipo transplastômico selecionado. Estas estratégias de seleção têm, por isso, o potencial de serem aplicadas a tecido verde, assim como a tecido não verde, para a transformação de plastídeos. O gene marcador de seleção letal *ppo* e o gene de resistência a antibiótico *aadA* são co-introduzidas nos alvos de transformação nas mesmas moléculas artificiais de ADN, em que a cassete *ppo* compreende a sua própria sequência flanqueadora, a qual é homóloga a um fragmento de ADN do plastídeo, ao passo que a cassete *aadA* está separada da sequência flanqueadora da cassete *ppo*. A cassete *ppo* compreende um promotor 5', o gene *ppo*, e uma 3'UTR, desenhada para a expressão no plastídeo, ao passo que a cassete *aadA* compreende um promotor 5', o gene *aadA*, e uma 3'UTR, desenhada para a expressão no plastídeo. O procedimento de seleção consiste em duas fases. Durante a primeira fase de seleção, as células contendo plastídeos transplastômicos são selecionadas em meio contendo o composto de seleção não letal espectinomicina ou estreptomicina. Em alternativa, o meio de seleção usado durante a primeira fase de seleção contém espectinomicina ou estreptomicina em combinação com o herbicida Fórmula XVII como agente seletivo letal para a célula. A seleção da primeira fase em meio contendo o composto não letal é realizada durante um período de tempo, no qual eventos de resistência não são ainda visualmente detetados. Um perito na especialidade irá saber como determinar este período de tempo, por exemplo, com base em parâmetros de cultura de tecidos que são específicos para a espécie da planta a ser transformada. A primeira fase de seleção dura cerca de cinco dias a cerca de oito semanas, mas especificamente de cerca de uma semana a cerca de seis semanas. Preferencialmente, a primeira fase de seleção é cerca de duas a quatro semanas.

Em alternativa, a primeira fase de seleção pode ser alargada até que os eventos de resistência se tornem detetáveis visualmente. Dependendo da espécie da planta a ser transformada, e do tipo de explante usado, os eventos de resistência tornam-se visíveis após cerca de uma semana a cerca de quinze semanas, mais especificamente após cerca de três semanas a cerca de dez semanas. Quando a primeira fase de seleção é alargada até que os eventos de resistência sejam visualmente detetados, a primeira fase de seleção dura tipicamente cerca de cinco semanas.

A segunda fase de seleção, a qual segue a fase inicial de seleção em espectinomicina, é realizada em meio contendo o agente letal para a célula Fórmula XVII como agente de seleção. O processo de segregação e seleção durante esta fase resulta na perda rápida do gene de resistência a antibiótico *aadA* e no estabelecimento de uma população homoplásmica de plastídeos, com o gene *ppo* integrado de forma estável nos seus plastomas. As células transplastômicas assim obtidas são depois regeneradas para plantas homoplásmicas, as quais expressam o gene *ppo* nos seus plastídeos, as quais transmitem os plastídeos transplastômicos à sua descendência. As plantas homoplásmicas com transplastoma PPO resultam numa muito maior tolerância a herbicidas do que as plantas com transformação nuclear com o mesmo gene. Adicionalmente, uma resistência muito maior a herbicidas é obtida com plantas transplastômicas homoplásmicas com expressão do gene *ppo* nos seus plastídeos, em comparação com plantas com transformação nuclear expressando *ppo* no núcleo.

Qualquer método disponível para a transformação de plastídeos de células vegetais pode ser empregado na presente invenção, que resulta em células vegetais contendo uma população de plastídeos, nos quais foi introduzido um

ácido nucleico recombinante contendo uma sequência de ADN que codifica para uma proteína que confere tolerância a um composto letal para plastídeos ou um composto não letal para plastídeos, qualquer que seja o caso. Os métodos de transformação de plastídeos incluem, mas não estão limitados a, bombardeamento de partículas, transformação mediada por PEG.

A transformação de genomas de plastídeo do tabaco foi descrita (Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8526-8530; Svab e Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917) e a transformação de plastídeos mediada por PEG é descrita por Koffer et al. (1998) *in Vitro Cell. Biol. Plant*, 34: 303-309. Outros métodos para a introdução de moléculas artificiais de ADN recombinantes em plastídeos de células vegetais são conhecidos do estado da técnica, e são descritos, por exemplo, em Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8526-8530, Sikdar et al. (1998) *Plant Cell Reports* 18: 20-24, PCT Publication WO 97/2977, e Sidorov et al. (1999) *Plant J.* 19(2): 209-216. Métodos adicionais para a introdução de duas moléculas artificiais de ADN num plastídeo de uma célula vegetal são descritos, por exemplo, em Carrer et al. *Biotechnology* 13: 791-794 (1995). Os métodos descritos nas referências anteriores podem ser utilizados para obter células vegetais transformadas com as moléculas artificiais de ADN para transformação de plastídeos descritas aqui. A regeneração de plantas inteiras, a partir de uma célula transformada contida no tecido usado na transformação, envolve várias fases de crescimento. Tipicamente, um tecido, tendo sido excisado de uma planta adulta ou plântula germinada, é colocado num meio definido quimicamente, em condições estéreis. Pelo cultivo do explante nestas condições controladas durante um período de tempo, uma massa indiferenciada de células, referida por calo, pode formar-

se. Através do cultivo deste calo sob o conjunto apropriado de condições, por exemplo, nutrientes, luz, temperatura, humidade, e fornecendo a combinação e concentração apropriadas de reguladores de crescimento vegetal, os calos podem ser induzidos a formar células diferenciadas, e regenerar os rebentos das plantas. Os rebentos das plantas, por vezes referidos como plântulas, contendo tecido meristemático, são depois transferidos para um meio para a indução de produção da raiz.

O meio seletivo usado e descrito aqui pode ser líquido ou sólido, como por exemplo pela adição de um agente de solidificação, como o agar. Meios seletivos líquidos permitem uma maior área de superfície de contato do tecido vegetal com o meio seletivo contendo determinadas hormonas, determinados agentes seletivos e outras substâncias necessárias para a obtenção de regeneração. As formas de realização divulgadas anteriormente são ilustrativas. Esta divulgação da invenção irá colocar o perito na especialidade na posse de muitas variações da invenção. Todas estas variações óbvias e previsíveis estão incluídas nas reivindicações anexas.

Exemplos

Exemplo 1: Preparação do vetor de transformação de plastídeo para integração transitória de *aadA*

1. Amplificação do promotor do gene 16S PEP-NEP rRNA ligado ao local de ligação ao ribossoma (RBS) *rbcL* de plastídeo de *N. tabacum*

O promotor do gene 16S PEP-NEP rRNA de milho (genoma completo do cloroplasto de *Zea mays*, número de acesso X86563, posição 94966 a 95115), foi isolado por

amplificação por PCR a partir do ADN de milho 6N615, usando um primer para a cadeia superior compreendendo um local de restrição para EcoRI, introduzido na extremidade 5' da região do promotor do gene 16S rRNA (SEQ ID NO: 5; 5'-GCCAGAATTCACCACGATCGAACGGGAATGGATA-3', o local de restrição de EcoRI está sublinhado), e um primer para a cadeia inferior que se estende até ao promotor de gene 16S rRNA, muta um ATG abaixo do local de iniciação da transcrição pela alteração de posição (T para G), liga o rbcL RBS de tabaco (genoma completo do cloroplasto de *N. tabacum*, número de acesso NC_001879, posição 577569 a 57585), como uma extensão 5' da extremidade 3' da 5'UTR do gene 16S rRNA e introduz um local BspHI na extremidade 5' de RBS (SEQ ID NO: 6; 5'-GCCGTCATGAATCCCTCCCTACAACCTGATTCGGAATTGTCTTTCCTTCCAAGGATAACTTGATCCAGGCGCTTCAG-3', local de restrição para BspHI está sublinhado). A amplificação por PCR foi realizada com o kit Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene, LaJolla CA), num Thermal Cycler 480 da Perkin Elmer, de acordo com as recomendações do fabricante (Perkin Elmer/Roche, Branchburg. NJ), como se segue: 5 min a 95°C, seguido de 5 ciclos de 1 min a 95°C / 2 min a 49°C / 1 min a 72°C, depois 25 ciclos de 1 min a 95°C / 2 min a 55°C / 1 min a 72°C.

A sequência de ADN do promotor do gene 16S PEP-NEP rRNA do plastídeo do milho, ligado ao local de ligação ao ribossoma (RBS) rbcL de plastídeo de *N. tabacum* é fornecida na SEQ ID NO: 4. Na representação da SEQ ID NO: 4 abaixo, a sequência do promotor do gene 16S rRNA está sublinhada; o nucleótido mutado está indicado a negrito; o codão de iniciação (ATG) está indicado em letras minúsculas:

```

1 GAATTCACCA CGATCGAACG GGAATGGATA AGAGGCTTGT GGGATTGACG
50 TGATAGGGTA GGGTTGGCTA TACTGCTGGT GGCCTAATCC AGGCTAATAA
100 TCTGAAGCGC CTGGATACAA GTTATCCTTG GAAGGAAAGA CAATCCGAA
150 TCAGTTGTAG GGAGGGATTC atg

```

II. Construção de um promotor de 16S rRNA de milho, ligado ao gene *rbcl* local de ligação ao ribossoma (RBS) de *N. tabacum*, o gene *ppo* de *Arabidopsis thaliana* e a cassete contendo 3'UTR de *rps16* de plastídeo de *N. tabacum*, para seleção e plastídeos.

O gene *ppo* quimérico de *A. thaliana* foi produzido através dos seguintes passos de clonagem. O plasmídeo pAT259 contendo as sequências codificantes de *ppo* de *Arabidopsis* foi produzido pela ligação de um fragmento EcoRI-SfuI com 450 bp compreendendo parte do gene *ppo* de *Arabidopsis*, o qual contém as mutações pontuais pAraC-2Met e pAra305 Leu (descritas em US 6,084,155), a um fragmento EcoRI-SfuI com 4,1 kb de pPH141 (também descrito em US 6,084,155). Um local de restrição SpeI foi adicionado à extremidade 3' do gene *ppo* por amplificação por PCR, usando pAT259 como modelo e o primer da cadeia superior seguinte (SEQ ID NO: 7; 5'-CCACGCACGCAAGGAGTTGA-3') e o primer da cadeia inferior (SEQ ID NO: 8; 5'-CGGTACTAGTCTGGGAGATTTAATGTT-3', local de restrição SpeI está sublinhado).

O plasmídeo pAT260 foi formado através da ligação do vetor pLITMUS28 de 2,8 bp digerido com NcoI-SpeI, com um fragmento NcoI-EcoRI com 1,1 kb de pAT259 contendo a extremidade 5' da sequência que codifica o gene *ppo*, e um fragmento EcoRI-SpeI amplificado por PCR, contendo a extremidade 3' do gene *ppo*.

O plasmídeo pAT263 foi obtido através da ligação de um fragmento NcoI-SpeI com 1,5 kb de pAT260, compreendendo a sequência codificante do gene *ppo* de *Arabidopsis*, com um fragmento EcoRI-SpeI com 2,8 kb de pAT229 (descrito em WO 00/20612), compreendendo a 3'UTR de *rps16* de plastídeo de tabaco integrado no vetor pUC19 (New England Biolabs), e a sequência EcoRI-NcoI do promotor 16SrRNA PEP-NEP-rbcL (RBS) de milho de com 145 bp, amplificada por PCR.

III. Amplificação e clonagem do promotor de *psbA* de plastídeo de *N. tabacum*.

O promotor do gene *psbA* de tabaco (genoma de cloroplasto completo de *N. tabacum*, número de acesso NC_001879, posição 1596 a 1745) foi isolado por amplificação por PCR de ADN isolado de *N. tabacum* cv. "Xanthi", usando um primer para a cadeia superior compreendendo um local de restrição introduzido para EcoRI na extremidade 5' da região do promotor do gene *psbA* (SEQ ID NO: 9; 5'-TTAAGAATTCTGAATAGATCTACATA-3', local de EcoRI está sublinhado), e um primer para a cadeia inferior compreendendo um local introduzido para NcoI no fim da 5'UTR de *psbA* (SEQ ID NO: 10; 5'-CAGCCATGGTAAAATCTTGGTT-3', local de restrição para NcoI está sublinhado). A amplificação por PCR foi realizada com o kit Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene, LaJolla CA) num Thermo Cycler 480 da Perkin Elmer, de acordo com as recomendações do fabricante (Perkin Elmer/Roche, Branchburg, NJ), como se segue: 1 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C / 1 min a 45°C / 1 min a 72°C, depois 10 min a 72°C. O produto de amplificação previsto de 161 bp foi digerido com EcoRI e NcoI, e ligado nos locais respetivos de pLITMUS28 (New England Biolabs, Beverly MA), para formar o plasmídeo pPB30.

IV. Preparação do gene quimérico contendo o promotor de psbA de *N. tabacum*, ligado a *aadA*.

O plasmídeo pPB37, compreendendo o promotor de psbA de tabaco acima da sequência codificante de *aadA*, um gene bacteriano que codifica uma enzima aminoglicosídeo adeniltransferase, que confere resistência a espectinomicina e estreptomicina, foi obtido através da ligação do vetor pLitmus28 digerido com EcoRI-SpeI com 2,8 kb, com o fragmento EcoRI-NcoI do promotor de psbA de tabaco de pPB30 e um fragmento BspHI-SpeI com 813 bp de pAT229, o qual contém a sequência que codifica *aadA*.

V. Construção de um gene quimérico contendo o promotor de cIpP de *Arabidopsis thaliana*, ligado a um gene repórter *gus*, e a 3'UTR de psbA de plastídeo de *A. thaliana*.

O plasmídeo pAT242 compreendendo o gene quimérico *gus*, foi obtido seguindo a seguinte estratégia de clonagem. O promotor de cIpP de *A. thaliana* foi amplificado por PCR, a partir do plasmídeo pPH146b (descrito em US 6,362,398), usando um primer para a cadeia superior, compreendendo um local de restrição introduzido para EcoRI na extremidade 5' da região do promotor do gene cIpP (SEQ ID NO: 11; 5'-GCGGAATTCATCATTCAGAAGCCCGTTCGT-3'; o local para EcoRI está sublinhado) e um primer para a cadeia inferior, compreendendo um local introduzido para BspHI na extremidade 5' da 5'UTR de cIpP (SEQ ID NO: 12; 5'-GCGTCATGAAATGAAAGAAAAAGAGAAT-3', o local de restrição para BspHI está sublinhado). A amplificação por PCR do fragmento de 250 bp foi realizada com o kit Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene, LaJolla CA) num Thermal Cycler 480 da Perkin Elmer, de acordo com as recomendações do fabricante (Perkin

Elmer/Roche, Branchburg. NJ), como se segue: 1 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C / 1 min a 45°C / 1 min a 72°C, depois 10 min a 72°C. O pAT242 foi produzido através da ligação do fragmento EcoRI-BspHI com 238 bp da amplificação por PCR do promotor de *cIpP* de *A. thaliana*, a um fragmento NcoI-HindIII com 2,1 kb de pAT221, contendo o gene *gus* ligado a 3'UTR de *psbA* de plastídeo de *A. thaliana* (descrito em WO 00/20612) e ao vetor pUC21 digerido com HindIII-EcoRI com 3,2 kb.

VI. Inserção dos genes *ppo* e *aadA* quiméricos num vetor de transformação de plastídeos do tabaco.

O plasmídeo pPB2 contendo os genes *ppo* e *gus* quiméricos, clonados em orientações opostas, foi construído através da ligação de um fragmento HindIII-EcoRI com 1,8 kb de pAT263, o qual foi completamente cortado com HindIII, mas apenas parcialmente cortado com EcoRI, contendo o gene quimérico 16S rRNA PEP-NEP-rbcL (RBS) de milho::*ppo*::3'UTR de *rps16* de *N. tabacum*, um fragmento EcoRI-PstI com 2,3 kb contendo o gene quimérico promotor de *cIpP* de *A. thaliana*::*gus*::3'UTR do gene *psbA* de *A. thaliana* do plasmídeo pAT242 e o vetor bluescript SK+ digerido com HindIII-PstI com 2,9 kb (Stratagene, LaJolla CA). O vetor de transformação de plastídeos pPB6 foi produzido flanqueando os genes quiméricos *ppo* e *gus* com sequência de cloroplasto do tabaco. Um fragmento compreendendo ambos os genes quiméricos de pPB2 foi ligado ao plasmídeo pAT218 linearizado com PstI (PTC WO 00/20612), contendo a sequência alvo do plastídeo. O vetor de transformação pPB97 foi produzido através da substituição da sequência que codifica o *gus* de pPB6 com o promotor de *cIpP* de *A. thaliana* pelo promotor de *psbA* de *N. tabacum*::cassete do gene *aadA* do plasmídeo pPB37. Um fragmento EcoRI-SpeI com

962 bp de um plasmídeo pPB37 totalmente digerido com EcoRI, mas parcialmente digerido com SpeI, foi ligado a um fragmento EcoRI-XbaI com 6,7 kb de um plasmídeo pPB6 totalmente digerido com XbaI, mas parcialmente digerido com EcoRI.

VII. Construção do vetor de transformação de plastídeos pEBPPot.

O vetor de transformação de plastídeos pEBPPot (SEQ ID NO: 1), para integração estável do gene *ppo* de *A. thaliana* no genoma de plastídeos, mas apenas para integração transitória do gene *aadA*, foi construído usando a seguinte estratégia. O gene quimérico promotor do *psbA* de *N. tabacum*::*aadA*:: 3'UTR de *psbA* de *A. thaliana* foi removido de pPB97 através de digestão parcial do plasmídeo com EcoRI e digestão total com HindIII. A seguir às digestões de restrição, as extremidades dos fragmentos resultantes foram tornadas cegas com a polimerase de ADN T4. Foi isolado um fragmento compreendendo o vetor com o gene *ppo* quimérico, a sequência alvo do plastídeo e um fragmento com 1,2 kb contendo o gene *aadA* quimérico. O fragmento do vetor com 6,5 kb foi autoligado para produzir pEBPPO. Este plasmídeo foi subsequentemente linearizado com NgomIV, tornado cego com a polimerase de ADN T4, e ligado ao fragmento cego *aadA* 1,2, para formar pEBPPot. Plasmídeos com o gene *aadA* quimérico em qualquer uma das orientações foram obtidos, mas apenas foi retido o que contém *aadA* orientado na direção do gene *bla* do vetor (Figura 1).

Exemplo 2: Preparação de um vetor de transformação de plastídeos para integração estável de ADN exógeno ligado ao gene *ppo* quimérico, sob o controlo do promotor do gene 16S Pep-Nep rRNA de milho, e integração transitória de um gene

***aadA* quimérico sob o controlo do promotor de *cIpP* de *N. tabacum*.**

O plasmídeo pBP96 foi obtido através de uma ligação de quatro vias, do promotor de *psbA* de plastídeo de *N. tabacum* digerido com EcoRI-NcoI com 149 bp, um fragmento NcoI-SpeI de pAT260 com 1,5 kb contendo a sequência que codifica *ppo* de *A. thaliana*, um fragmento BamHI-SpeI de pPB67b com 4,0 kb, contendo a 3'UTR de *rps16* de *N. tabacum* ligado à porção 16S rDNA de *N. tabacum* da sequência alvo de plastídeo, e o vetor pBluescript SK+, e um fragmento EcoRI-BamHI de pPB67b com 1,9 kb, o qual contém uma porção da sequência alvo de plastídeo *rps7/12*. O vetor de transformação de plastídeo pEB8 foi obtido através da ligação de um plasmídeo pPB96 linearizado com NgomIV, com extremidades cegas, com um fragmento cego 1,2 contendo um promotor de *cIpP* de plastídeo de *N. tabacum* (descrito em US 6,084,155), ligado ao gene *aadA* e 3'UTR do gene quimérico *rps16* de plastídeo de *N. tabacum*, produzindo os plasmídeos pEB8a e pEB8b, os quais diferem apenas na orientação do gene *aadA* quimérico no plasmídeo. Apenas pEB8a (SEQ ID NO: 2, Figura 2), com *aadA* dirigido na direção do gene *bla* do vetor foi retido para a transformação de plastídeos.

Exemplo 3: Transformação biolística do genoma de plastídeo do tabaco com o vetor de transformação de plastídeos pEBPPot e pEB8 e seleção (ver Exemplo 6 para uma descrição detalhada dos métodos de transformação e seleção).

Após a introdução de pEBPPot (Figura 1, SEQ ID NO: 1) ou pEB8 (Figura 2, SEQ ID NO: 2) nos plastídeos, o vetor completo é integrado no genoma do plastídeo num primeiro evento de recombinação. Os plastídeos transformantes iniciais são selecionados por espectinomicina devido à

expressão do gene *aadA* integrado de forma transitória no genoma dos plastídeos. Uma vez que as sequências cpDNA que flanqueiam o gene *ppo* no vetor fornecem dois loci diferentes para cruzamento, a recombinação entre o genoma de plastídeo e o vetor resulta numa população mista de genomas transformados, contendo o vetor inserido em diferente conformação (A e B). A mudança para seleção por butafenacil favorece a inserção estável do gene *ppo* e a excisão do gene *aadA*, juntamente com a sequência do esqueleto do vetor. A perda da sequência do vetor é mediada por um evento de intra-recombinação entre sequências de ADN repetidas diretas, que são criadas quando o vetor é inserido no genoma. Além disso, a segregação da população de plastídeos sob a seleção de butafenacil, resulta no enriquecimento de genomas de plastídeo transformados com *ppo*, sem o marcador *aadA*, e irá finalmente levar a células homoplásmicas.

A análise por PCR das amostras de ADN de eventos pEBPP0t e pEB8 selecionados, obtidos a partir da seleção inicial com espectinomicina mostrou que, tanto o gene *aadA* quanto o gene *ppo* estão presentes nos transformantes. Subsequentemente, após duas a três rondas de subcultura em meio contendo butafenacil, a análise por PCR de amostras de ADN dos mesmos eventos confirmou a perda do gene *aadA*, ao passo que o gene *ppo* é retido nos transformantes.

A análise por Southern blot foi usada para demonstrar que o gene *ppo* pode ser inserido no genoma do plastídeo para homoplasmicidade após seleção por butafenacil. O ADN celular total de dez transformantes pEBPP0t que foram sujeitos a três ou quatro rondas de subcultura em condições seletivas com butafenacil foi analisado através de hibridização por Southern blot. O ADN de tipo selvagem e de

transformantes foi digerido com BamHI e hibridizado com uma sonda específica para ADN de cloroplasto (cpDNA). Esta sonda hibridizou com um fragmento de ADN tipo selvagem com 3,3 kb, ao passo que hibridizou predominantemente com um fragmento de ADN com 5,1 kb em oito dos transformantes, indicando que o gene *ppo* com 1,8 kb é inserido em homoplasmicidade na maioria destes eventos. Nas linhas 4 e 9, ambos os fragmentos são detetáveis, indicando a ocorrência de uma população heteroplásmica (mista) de genomas de plastídeo tipo selvagem e transformados com *ppo*. Quatro populações de genomas de plastídeo diferentes são observadas nestas linhas: um genoma tipo selvagem (3,3 kb), um genoma transformado com *ppo* (5,1 kb) e genomas com o vetor inserido em duas conformações diferentes (inserção do vetor A e B, 7,6 e 5,8 kb, respetivamente). A incubação do Southern blot de BamHI com uma sonda específica para *aadA*, confirmou que os transformantes homoplásmicos perderam o marcador de antibiótico e que o vetor foi inserido numa conformação diferente (fragmentos BamHI com 7,6 e 5,8 kb) nos genomas de plastídeo das linhas heteroplásmicas 4 e 9. Um Southern blot de amostras de ADN digeridas com SpeI, incubado com a mesma sonda para *aadA*, também mostrou que apenas as linhas heteroplásmicas 4 e 9 têm o marcador de antibiótico (0,9 kb), ao passo que os outros transformantes o perderam.

Análise de hibridização Southern de ADN digerido com BamHI para a identificação de plastídeos transformantes pEBPPot homoplásmicos.

A análise de Southern blot foi usada para demonstrar que o ADN exógeno ligado ao gene *ppo* do vetor pEB8 pode ser inserido no genoma do plastídeo de forma homoplásmica, após seleção com butafenacil. O ADN celular total de dois transformantes pEB8 que foram sujeitos a quatro rondas de subcultura em condições seletivas para butafenacil, foi

analisado por hibridização de Southern blot. O ADN de tipo selvagem e dos transformantes foi digerido com BamHI e hibridizado com uma sonda específica para ADN de cloroplastos (cpDNA). Esta sonda hibridizou com um fragmento de ADN tipo selvagem com 3,3 kb, ao passo que hibridizou predominantemente com um fragmento de ADN com 6,1 kb dos transformantes, indicando que a sequência de 2,8 kb contendo o ADN exógeno ligado ao gene *ppo* é inserido em homoplasmicidade nestes eventos.

Exemplo 4: Preparação do vetor de transformação de plastídeos para integração instável de *aadA*

I. Clonagem de um novo locus alvo de plastídeo

Um fragmento com 4,7 kb do ADN de plastídeo de tabaco (genoma completo do cloroplasto de *N. tabacum*, número de acesso NC_001879, posição 93132 a 97844 e 144782 a 149494), foi isolado por amplificação por PCR a partir de ADN isolado de *N. tabacum* cv. "Xanthi", usando um primer de cadeia superior compreendendo um local de restrição introduzido para XhoI (SEQ ID NO: 13; 5'-AGTTATCTCGAGTGAGAGAAAGAAGTGAGGAAT-3', local de XhoI está sublinhado), e um primer de cadeia inferior compreendendo um local XbaI (SEQ ID NO: 14; 5'-TTCTCTAGAAAGAAATACGGGG-3', local de restrição de XbaI está sublinhado). A amplificação por PCR foi realizada com o kit Pfu Turbo polymerase (Stratagene, LaJolla CA) num Thermal Cyclor 480 da Perkin Elmer, de acordo com as recomendações do fabricante (Perkin Elmer/Roche, Branchburg. NJ), como se segue: 1 ciclo a 95°C, durante 5 min em que a enzima foi adicionada 2 min antes do final do ciclo, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94°C / 1 min a 45°C / 4 min a 72°C, depois 1 ciclo durante 10 min a 72°C. O produto de

amplificação previsto de 4,7 kb foi digerido com XboI e XbaI, e ligado nos respectivos locais de pLITMUS28 (New England Biolabs, Beverly MA), para formar o plasmídeo pEBNY2.

II. Construção do novo vetor de transformação de plastídeos

O plasmídeo pENBY2 foi linearizado com a endonuclease de restrição PstI. O gene *aadA* quimérico foi removido de pPB97 através da digestão parcial do plasmídeo com EcoRI e corte completo com HindIII. Após as digestões de restrição, as extremidades do plasmídeo pEBNY2 de 7,5 kb linearizado com PstI e as do fragmento HindIII-EcoRI com 1,2 kb contendo o gene *aadA* quimérico foram tornadas cegas com a polimerase de ADN T4. Subsequentemente, estes fragmentos foram ligados um ao outro para formar o plasmídeo pEBNY2+*aadA*. Os plasmídeos contendo o gene *aadA* quimérico em qualquer uma das orientações, foram obtidos, mas apenas foi retido o que tinha *aadA* orientado na direção oposta ao gene *ycf2*.

O plasmídeo pEBNY2+*aadA* foi linearizado com a endonuclease de restrição NdeI. O gene *ppo* quimérico foi removido de pEBPPO, cortando-o com a endonuclease de restrição PstI. Após as digestões de restrição, as extremidades do plasmídeo pEBNY2+*aadA* com 8,6 kb linearizado com PstI e as do fragmento com 1,8 kb contendo o gene *ppo* quimérico, foram tornadas cegas com polimerase de ADN T4. Subsequentemente, estes fragmentos foram ligados um ao outro para formar o plasmídeo pNY2C (SEQ ID NO: 3, Figura 3). Os plasmídeos contendo o gene *ppo* quimérico em qualquer uma das direções foram obtidos, mas apenas foi retido o que tinha *ppo* orientado na mesma direção que o gene *ycf2*.

Exemplo 5: Transformação biolística do genoma de plastídeo do tabaco com pNY2C, e seleção (ver Exemplo 6 para uma descrição detalhada do método de transformação e seleção).

Após introdução do ADN do vetor no plastídeo, os transformantes são selecionados para a resistência à espectinomicina, a qual é conferida pelo gene *aadA* integrado no gene essencial *ycf2*. As sequências de plastídeo que flanqueiam os genes dos dois marcadores de seleção dentro do vetor de transformação de plastídeos fornecem 3 loci diferentes de recombinação, e combinações diferentes de cruzamento duplo irão produzir uma população mista de genomas de plastídeo transformados, contendo qualquer um ou ambos os marcadores de seleção. A substituição da seleção por butafenacil irá resultar na segregação da população de genomas de plastídeo mista, e a seleção de plastídeos homoplásmicos que expressam o gene *ppo*. A pressão seletiva natural irá favorecer a cópia tipo selvagem do gene essencial e irá por isso resultar na perda completa do gene *aadA*.

A análise por PCR das amostras de ADN de eventos obtidos da seleção inicial com espectinomicina mostrou que os genes *aadA* e *ppo* estão presentes nos transformantes. Subsequentemente, após duas ou três rondas de subcultura em butafenacil, a análise de PCR de amostras de ADN dos mesmos eventos confirmou a perda do gene *aadA*, ao passo que o gene *ppo* é retido nos transformantes.

A análise por Southern blot foi usada para determinar que o gene *ppo* podia estar inserido no genoma de plastídeo e que células homoplásmicas foram obtidas após seleção com butafenacil. O ADN celular total de 20 transformantes que foram submetidos a três a quatro rondas de subcultura em

meio contendo butafenacil foi analisado por hibridização por Southern blot. O ADN de tipo selvagem e de transformantes foi digerido com NcoI e hibridizado com uma sonda de ADN específica para a sequência de plastídeo de tabaco (NC_001879, posições 96811 a 97844). Esta sonda, a qual reconhece um fragmento com 2,6 kb resultante de NcoI no tipo selvagem, hibridizou predominantemente com um fragmento de ADN com 4,4 kb em todos os transformantes, indicando que o gene *ppo* com 1,8 kb se encontra inserido de forma estável no plastoma, e que os transformantes homoplásmicos foram selecionados nestes eventos.

A análise por Southern blot também revelou que a inserção de *aadA* no gene essencial *ycf2* após seleção por espectinomicina é instável. A análise por Southern blot de amostras de ADN recolhidas dos 20 transformantes que foram descritos anteriormente após seleção inicial em meio contendo espectinomicina, indicou que o gene *aadA* quimérico foi inserido no gene de plastídeo alvo essencial, mas que as células permaneceram no estado heteroplásmico, uma vez que foi retido um certo número de cópias de tipo selvagem. Uma sonda de ADN para plastídeo de tabaco (NC_001879, posição 94408 a 95861), específica para o locus alvo de *aadA*, hibridizou com os fragmentos tipo selvagem com 1,4 kb e com o fragmento contendo a inserção *aadA* com 2,6 kb, em todos os transformantes. Após várias rondas de seleção em butafenacil, a sonda reconheceu apenas o fragmento de ADN tipo selvagem com 1,4 kb, indicando que todos os genomas reverteram para o tipo selvagem e que o gene *aadA* foi perdido quando a pressão seletiva da espectinomicina foi removida. Adicionalmente, não se observou qualquer sinal de hibridização quando o Southern blot foi hibridizado com uma sonda específica para *aadA*.

Exemplo 6: Transformação e Seleção de Plastídeos

I. Germinação de Sementes

Sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum*) são esterilizadas com etanol a 70% durante vários minutos, lavadas três a cinco vezes com água estéril e depois colocadas em meio de germinação (Tabela 2, 3). As placas de germinação são incubadas a cerca de 25°C com um fotoperíodo de 12-16 horas. O meio de germinação (GM) é como se segue: Macro-sais MS 1/2x; Micro-sais MS 1x; vitaminas GM (100x) 10 mL/L; Na₂EDTA 75 mg/L; FeCl₃ · 6H₂O 27 mg/L; Sacarose 10 g/L; Fito-agar 8 g/L; e pH ajustado para 5,5. As vitaminas GM (100 x) são misturas como se segue: Inositol 10 g /L; Biotina 5 mg/L; Piridoxina 50 mg/L; Tiamina 50 mg/L; Ácido Nicotínico 500 mg/L; Ácido Fólico 50 mg/L; e Glicina 200 mg/L.

II. Preparação de Explantes e Introdução de ADN

As folhas de plântulas de tabaco com cerca de 2 semana são colocadas com o lado adaxial ("lado de cima") para cima, no centro das placas contendo meio de cultura para tabaco (Tabela 4). Alternativamente, as vitaminas neste meio podem ser substituídas por 100 mg/L de inositol e 1 mg/L de tiamina. O bombardeamento de partículas é realizado no mesmo dia. O meio de cultura de tabaco é como se segue: Sais MS 1x; Vitaminas MS 1/2x; Vitaminas B5 1/2x; BAP 1 mg/L; NAA 0,1 mg/L; Sacarose 30 g/L; e agar purificado da Sigma 6 g/L com o pH ajustado para 5,8.

A preparação das partículas de ADN é realizada como se segue: 60 mg de partículas (tungsténio ou ouro) são esterilizadas com 0,5 mL de etanol a 70%, lavadas duas

vezes com 0,5 mL de água duplamente destilada estéril, e depois ressuspensas em 1 mL de glicerol a 50%. A uma alíquota de 100 µL da suspensão de partículas, 10 µL de CaCl_2 a 2,5 M, 50 µL de espermidina a 0,1 M são adicionados sequencialmente, sendo misturado gentilmente com cada adição. As partículas revestidas com ADN são brevemente centrifugadas, o que se segue de uma lavagem com 200 µL de etanol a 70% e outra lavagem com 200 µL de etanol a 100%. Depois, elas são ressuspensas em 100 µL de etanol a 100%. Para cada bombardeamento, são usados 5 a 10 µL de partículas de ADN.

O bombardeamento é executado usando uma pistola de hélio PDS 1000 (BioRad, Richmond, CA), seguindo uma modificação do protocolo descrito pelo fabricante. As placas com os explantes a bombardear são colocadas na terceira prateleira a contar de baixo de uma câmara de vácuo, bombardeadas com discos de rutura 650 p.s.i., com tiros únicos ou múltiplos por placa.

III. Seleção de plantas transplastômicas homoplásmicas, com expressão do gene *ppo* nos seus plastídeos

a) Seleção inicial

A seleção inicial é realizada com espectinomicina como agente de seleção, ou com a combinação de espectinomicina e Fórmula XVII, no caso de seleção dupla. A espectinomicina é adicionada a 500 mg/L de meio de cultura de tabaco em qualquer caso, ao passo que a Fórmula XVII é adicionada ao meio na concentração de cerca de 2 nM para cerca de 10 nM, preferencialmente cerca de 5 nM a cerca de 25 nM, ou em alternativa, cerca de 25 a cerca de 50 nM.

Uma semana após o bombardeamento, os explantes são transferidos para meio de cultura de tabaco contendo o ou os agentes de seleção, com os lados bombardeados em contato direto com o meio de seleção. Quando a Fórmula XVII é incluída no meio de seleção, é preferível cortar os explantes em pedaços pequenos, para facilitar a seleção mais eficiente. Após cerca de duas a quatro semanas de seleção em meio contendo espectinomicina, os explantes ou, se identificáveis, os transformantes resistentes são levados para a próxima fase de seleção para a obtenção de plantas homoplásmicas com expressão do gene *ppo* nos seus plastídeos.

O fenótipo de seleção do sistema de seleção duplo é notavelmente diferente do fenótipo obtido com apenas a seleção por espectinomicina. Com a seleção apenas por espectinomicina, o fenótipo de seleção é pigmentado verde, no qual os transformantes pigmentados verdes são identificados por oposição ao tecido não transformado branco. Em contraste, no meio de seleção contendo Fórmula XVII, os transformantes aparecem sempre como calos brancos ou amarelados, num fundo de tecido não transformado castanho.

O fenótipo de seleção com composto de seleção letal Fórmula XVII é particularmente importante para a seleção dos tipos de tecidos que não se tornariam verdes nas condições de cultura usadas para a seleção. É mais desejável e praticável selecionar tecidos brancos ou amarelados contra os tecidos castanhos, tal como no caso do composto letal Fórmula XVII, do que selecionar tecido branco ou amarelado contra o tecido branco.

b) Seleção secundária de eventos homoplásmicos com expressão do gene *ppo* no plastoma.

Os explantes bombardeados ou os transformantes primários selecionados são transferidos para meio de cultura de tabaco contendo apenas Fórmula XVII como agente de seleção, a concentrações de cerca de 25 nM a cerca de 50 nM ou cerca de 50 nM a cerca de 250 nM, para segregação e seleção adicionais. Os tecidos são cortados em pedaços pequenos durante a cultura e cada subcultura destes, para garantir melhor contato do tecido com o meio, e por isso uma seleção mais eficiente. Após várias rondas de seleção, as amostras dos transformantes são recolhidas e analisadas por Southern blot. De dez transformantes independentes analisados, oito foram confirmados como transformantes homoplásmicos com o gene *ppo* integrado nos seus plastomas, mas não o gene *aadA*. Os outros dois eventos eram heteroplásmicos contendo ambos os genes (Tabela 1).

IV. Regeneração de plantas homoplásmicas e expressão do gene *ppo* nos plastídeos

Eventos *ppo* homoplásmicos são regenerados para formar rebentos em meio de cultura de tabaco contendo o agente de seleção. A concentração de citocinina no meio pode ser duplicada para aumentar a regeneração. Os rebentos obtidos são enraizados individualmente em meio de cultura de tabaco sem hormonas, com ou sem o agente de seleção.

A homoplasmicidade de cada planta individual transferida para a estufa foi confirmada por Southern blot ou PCR. Todas as plantas são férteis e exibem um fenótipo normal.

A expressão do gene *ppo* em plantas homoplásmicas é avaliada por um ensaio de ELISA. Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos para os transformantes nucleares de tabaco, com expressão do gene *ppo* no núcleo. O ensaio de ELISA demonstrou um aumento significativo da concentração

de proteína PPO nos plastídeos transformantes das plantas, em comparação com os transformantes nucleares (Tabela 5).

Tabela 1. Quantificação da proteína PPO em plantas transplastômicas e em transformantes nucleares com expressão do gene ppo

Número do evento plastídeo	Proteína PPO por proteína total	Número do evento nuclear	Proteína PPO por proteína total
	[ng/mg]		[ng/mg]
814	127,12	2200	6,0
815	138,43	2203	2,4
816	147,72	2212	0,1
818	143,90	2213	2,6

Exemplo 7: Transformação de plastídeos de tomate

O tomate Syngenta elite com genótipo ZTV840 foi usado para a transformação de plastídeos. A esterilização e germinação das sementes, e o bombardeamento das folhas foram realizados como descrito anteriormente para o tabaco (Exemplo 6).

Dois dias após o bombardeamento, as folhas de tomate foram transferidas para o meio de seleção com 500 mg/L de espectinomicina, e cultivadas com pouca luz. Um mês mais tarde, as folhas foram cortadas em pequenos pedaços e subcultivadas no mesmo meio de seleção. Os eventos transplastômicos começaram a aparecer após dois meses de seleção. Dois eventos foram obtidos de 10 placas bombardeadas com uma molécula artificial de ADN estável *aadA* : PPO, e outros dois eventos de 11 placas bombardeadas com a molécula artificial de ADN *aadA* transiente : PPO estável (pEBPPot).

Quando os quatro eventos apareceram, eles consistiram em calos muito frágeis e moles, com muito pouca cor verde. Estes eventos foram então transferidos para meio contendo 50 a 75 nM de Fórmula XVII para a segunda fase de seleção. Três dos quatro eventos sobreviveram à seleção com Fórmula XVII e continuaram a crescer em meio de seleção durante mais de seis meses.

Exemplo 8: Níveis elevados de tolerância a herbicida, obtidos com plantas transplastômicas PPO homoplásmicas

Níveis muito mais elevados de tolerância a herbicida são obtidos com plantas homoplásmicas transplastômicas que expressam o gene *ppo* nos seus plastídeos, do que com os transformantes nucleares que expressam *ppo*. As plantas de tabaco transplastômicas PPO sobreviveram muito bem a tratamento com Fórmula XVII até concentrações de 2000 nM, o nível mais elevado de herbicida testado, ao passo que no mesmo estudo, os transformantes nucleares mostraram sensibilidade quando tratadas com Fórmula XVII a uma concentração acima de 100 nM.

Exemplo 9: Expressão de transgenes em plastídeos usando um promotor novo

A invenção seguinte fornece sequências de ácidos nucleico de origem não plastidial, úteis para a expressão de genes transgênicos em plastídeos. Existe apenas um número limitado de elementos regulatórios genéticos, tais como promotores, região não traduzida 5' (5'UTR) e região não traduzida 3' (3'UTR), disponíveis para a expressão de transgenes em plastídeos, e a maioria deles são sequências de plastídeos. Uma vez que os genomas de plastídeos são altamente ativos em recombinação homóloga, a inserção no

genoma de sequências endógenas como elementos regulatórios pode originar rearranjos genômicos que resultam na perda ou inativação da função transgênica. Para prevenir este rearranjo genômico, devem ser usadas, como elementos regulatórios, sequências estranhas que partilham pouca homologia com a sequência de ADN genômica dos plastídeos, para a expressão de transgenes em plastídeos.

Novo promotor

A sequência tipo promotor de bacteriófagos X2 de *Staphylococcus aureus*, a qual foi descrita como sendo capaz de promover expressão genética em *E. coli* (Carbonelli et al., FEMS Micro. Letters 177: 75-82, 1999), foi testada para a sua capacidade para promover expressão genética em plastídeos de tabaco. A sequência X2 (SEQ 10) contém características de promotor tipo bactéria, como por exemplo, uma região canônica hexanucleótidos-10 (TATAAT) e -35 (TTGCTG) e uma caixa de promotor -16 (TRTG), que também é observada em muitos promotores PEP de cloroplastos. A sequência X2 (posição 141 a 219 da sequência publicada) foi ligada a uma sequência não traduzida 5' funcional no plasmídeo, e ligada a um gene repórter, num vetor de transformação de plastídeos de tabaco. SEQ ID: 15 promotor de bacteriófago X2 de *Staphylococcus aureus*

```

GTAAAGAAT GTAGCTGACT GCATACTTAA ACCACCCATA CTAGTTGCTG GGTGGTTTTT 60
ATGTTATAAT ATAAATGTG

```

79

Novas regiões 5' não traduzidas com sequências tipo Shine-Dalgarno

Em plastídeos de plantas, as sequências 5'UTR do ARNm são essenciais para a estabilidade do ARNm e o processo de início da tradução. As 5'UTRs da maioria dos genes de

plastídeo muito expressos contêm uma sequência tipo Shine-Dalgarno, que é complementar à extremidade 3' do ARNr 16 S de plastídeo, e que se acredita desempenhar um papel predominante na iniciação da tradução. É possível que sequências estranhas que contêm uma sequência tipo Shine-Dalgarno possam funcionar como elemento de tradução de genes de plastídeos. Foi demonstrado previamente que a sequência 5'UTR do gene 10 de bacteriófago T7, a qual contém um elemento SD, é muito eficiente na promoção da tradução de plastídeos (McBride et. Al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 7301-7305; Ye et al., (2001) Plant J. 25: 261-270; Kuroda e Maliga (2001) Nucl. Acids Res. 29: 970-975). A seguinte sequência do gene 10 do bacteriófago de *Kluyvera* e gene 9 do bacteriófago T3 foi testada para a sua capacidade para atuar como sequência 5'UTR, para expressão de genes de plastídeo.

SEQ ID NO: 16 5'UTR do gene 10 de bacteriófago *kvpI* de *Kluyvera*

```
tctagaGACA TTACGTTCTC CCCTTGAGTG ATACACAATG AGAACCAACT CGTTTCAAGT 60
AGTACCTCAC ATAACCTTATC TTTTAAATCA ACAGAAGGAG ATTCAcCatg 110
```

SEQ ID NO: 17 5'UTR do gene 9 de bacteriófago T3

```
tctagAGGGA GACCTCATCT TTGAAATGAG CGATGACTAA AGGTTGGAGT CCTTTGGTTT 60
CCCTTTATCT TTAATAACTT AGGAGATTTA ATtcatg 97
```

Construção do vetor de transformação de plastídeos com PPO como marcador de seleção, o qual está sob o controle do promotor do bacteriófago X2

Amplificação de 5'UTR do gene 10 de bacteriófago *kvpI*

A 5'UTR do gene 10 de *kvpI* foi isolada através de amplificação por PCR, a partir de um plasmídeo contendo o gene 10 de *kvpI*, usando um primer para a cadeia superior compreendendo um local de restrição introduzido para *XbaI*

na extremidade 5' da região 5'UTR (5' GTTCTAGAGACATTACGTTCTCCCCTTG 3' (local de XbaI está sublinhado) SEQ ID NO: 28), e um primer para a cadeia inferior compreendendo um local de restrição introduzido para NcoI, sobrepondo o codão de iniciação ATG (5' AGATATCCATGGTGAATCTCCTGTTGATT 3' (local de restrição para NcoI está sublinhado) SEQ ID NO: 29). A amplificação por PCR de um fragmento de 119 bp foi realizada com o kit taq DNA Polymerase (QUIAGEN, Valencia CA) num Thermal Cyclor 480 da Perkin Elmer, de acordo com as recomendações do fabricante (Perkin Elmer/Roche, Branchburg. NJ), como se segue 5 min a 95°C, seguido de 5 ciclos de 1 min a 95°C / 1 min a 40°C / 15 seg a 72°C, depois 25 ciclos de 1 min a 95°C / 1 min a 55°C / 15 seg a 72°C.

O plasmídeo pEBPKVP-10 foi construído através da ligação do fragmento com 105 bp XbaI-NcoI do fragmento amplificado da 5'UTR do gene 10 de *kvpI* com o fragmento amplificado com 8,0 kb de XbaI-NcoI do vetor pEBPaccD. O plasmídeo pEBPKV10-GFP foi construído através da ligação de um fragmento NcoI-BamI com 5,2 kb a partir de pEBPKV10, com um fragmento com 1,8 kb de pPB69b, contendo o gene da proteína fluorescente verde (GFP), ligado a 3'UTR de *psbA* de plástideo de *A. thaliana*.

O promotor de 16S NEP-PEP de milho foi amplificado através de PCR de pPB98, usando um primer superior compreendendo um local de restrição para EcoRI na extremidade 5' da região do promotor de 16S rRNA (5' GCCAGAATTCACCACGATCGAACGGGAATGGATA 3' (local de EcoRI está sublinhado)) (SEQ ID NO: 20) e um primer para a cadeia inferior compreendendo um local de restrição introduzido para XbaI na extremidade 3' da região do promotor do gene 16S rRNA (5' CTCTAGAGATTTCGGAATTGTCTTTCCTT 3' (local de restrição para XbaI está sublinhado) SEQ ID NO: 21). A amplificação por PCR de um fragmento com 164 bp foi

realizada com o kit Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene, LaJolla CA) num Thermal Cyclor 480 da Perkin Elmer, de acordo com as recomendações do fabricante (Perkin Elmer/Roche, Branchburg. NJ), como se segue 5 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95°C / 1 min a 50°C / 15 seg a 72°C.

A sequência do promotor de 16S rRNA amplificada foi cortada com XbaI e EcoRI e o fragmento com 152 bp resultante foi ligado a um fragmento XbaI-EcoRI com 6,0 kb do vetor de transformação de plástídeos pB98. O plasmídeo resultante foi subsequentemente cortado com XbaI e BamHI e um fragmento com 5,1 kb isolado da digestão foi ligado com um fragmento XbaI-BamHI com 1,9 kb de pEBPKVP10-GFP, contendo o 5'UTR do gene 10 de *kpvI::GFP::3'UTR* de *psbA* de *A. thaliana* quimérico, para produzir pEBZM16SKGFP.

Construção do plasmídeo RTK7

A 5'UTR de bacteriófago T3 com 116 bp foi amplificada por PCR a partir de um plasmídeo, usando um primer para a cadeia superior (RTK36) compreendendo um local de restrição introduzido para NcoI na extremidade 3' da 5'UTR do gene 9 de T3 (5' GAAGATGCCATGGATTAAATCTCCTAAGTTATTAAAG 3' (local de NcoI está sublinhado) SEQ ID NO: 22) e o primer para a cadeia inferior (RTK39) compreendendo um local introduzido para SmaI na extremidade 5' da 5'UTR (5' CGAATCTCTTCCCGGGTAGAGGGAGACCTCATCTTTG 3' (local de restrição para SmaI está sublinhado) SEQ ID NO: 23). Um fragmento com 328 bp contendo o promotor do gene 16S PEP-NEP rRNA de milho e o promotor do gene *psbA* do tabaco foi amplificado por PCR a partir de pEBT3-9 GFP, usando um primer superior (RTK38) compreendendo um local de restrição introduzido para SmaI na extremidade 3' do promotor de 16S PEP-NEP de milho (5' CTCCCTCTACCCGGAAGAGATTTCGGAATTGTCTTTCC

3' (local de SmaI está sublinhado) SEQ ID NO: 24) e um primer para a cadeia inferior (RTK37), compreendendo um local introduzido para BspHI na extremidade 3' de 5'UTR de psbA (5' CGCTTAGTCATGATAAAAATCTTGGTTTATTTAATCATC 3' (local de restrição para BspHI está sublinhado) SEQ ID NO: 25). Os produtos de PCR foram purificados, misturados em proporções molares iguais com primers RTK36 e RTK37, e a mistura foi usada para amplificar através de PCR um fragmento com 42 bp. Os PCRs foram realizados com o kit Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene, LaJolla CA) num Thermal Cyclor 480 da Perkin Elmer, de acordo com as recomendações do fabricante (Perkin Elmer/Roche, Branchburg. NJ). Para construir o plasmídeo RTK7, o plasmídeo RTK6 contendo os genes ppo e gus clonados em orientação oposta, foi primeiro construído através da ligação de um fragmento HindIII-NcoI com 7,5 kb de pEB8a, o vetor de transformação com o gene quimérico ppo::3'UTR rps16 de tabaco, com um fragmento HindIII-NcoI com 2,1 kb contendo o gene gus::3'UTR de psbA de *A. thaliana* do plasmídeo pEBPkvpl10. O plasmídeo RTK7 foi por fim construído através da ligação de RTK6 linearizado com NcoI de 9,6 kb com os promotores de 16S e psbA de milho NcoI-BspHI amplificados por PCR. Apenas foi retido o plasmídeo com o promotor de psbA controlando ppo e o promotor de 16S PEP-NEP de milho controlando gus.

Construção da sequência tipo promotor de bacteriófago X2 ligada ao gene quimérico 5'UTR do gene 10 de kvpl: GFP::3'UTR de psbA de plastídeo de *A. thaliana*.

Um fragmento EcoRI-XbaI com 85 bp, consistindo na sequência tipo promotor do bacteriófago X2 foi produzida através da hibridização de um oligonucleótido da cadeia superior (5' AATTCGTTAAAGAATGTAGCTGACTGCATACTTAAACCACCCATACTAGTTGCTG GGTGGTTTTTATGTTATAATATAAATGTGT 3') (SEQ ID NO: 26) com o seguinte oligonucleótido complementar da cadeia inferior (5' CTAGACACATTTATATTATAACATAAAAACCACCCAGCAACTAGTATGGGTGGTT

TAAGTATGCAGTCAGCTACATTCTTTAACG 3') (SEQ ID NO: 27). O plasmídeo PEBX2 foi construído através da ligação do fragmento EcoRI-XbaI com 85 bp, construído com um fragmento EcoRI-XbaI com 6,8 kb do plasmídeo pEBZM16SKGFP, contendo 5'UTR do gene 10 de *kvp1::GFP::3'UTR* de *psbA* de *A. thaliana* com o resto do vetor de transformação de plastídeos.

Construção do vetor de transformação de plastídeos pEB10

O plasmídeo pEB9 foi construído através da ligação de um fragmento BgIII-NcoI com 200 bp de pEBX2, contendo a sequência tipo promotor X2 ligada a 5'UTR do gene 10 de *kvp1*, com um fragmento BgIII-NcoI do vetor de transformação de plastídeos pEB8a com 8,5 kb.

1 AATTCGTTAA AGAATGTAGC TGACTGCATA CTTAAACCAC CCATACTAGT
 50 TGCTGGGTGG TTTTATGTT ATAATATAAA TGTGICTAGA GACATTACGT
 100 TCTCCCTTG AGTGATACAC AATGAGAACC AACTCGTTTC AAGTAGTACC
 150 TCACATAACT TATCTTTTAA ATCAACAGAA GGAGATTAC Catg

Sequência de ADN das sequências tipo promotor quiméricas do bacteriófago X2 de *Staphylococcus aureus* ligadas a 5'UTR do gene 10 do bacteriófago *kvp1*. A sequência X2 está sublinhada; o codão de iniciação (ATG) está em letras minúsculas. (SEQ ID NO: 18).

O vetor de transformação de plastídeos pEB10 final foi construído através da ligação de um fragmento BgIII-HindIII com 7,8 kb, a um fragmento com 2,3 kb de pRTK7, contendo o gene quimérico pMz16SNEP::T3-9 5'UTR::uidA::3'psbA.

Exemplo 10: Transformação de plastídeos com pEB10

O gene repórter foi introduzido de forma estável no genoma de plastídeo de tabaco, usando o protocolo de seleção dupla para transformação de plastídeos descrito no pedido de patente US 70149. De seis plastos bombardeados, foi

encontrado um evento com capacidade para crescer em 50 nM de butafenacil após duas rondas em espectinomicina. Após 3 rondas de seleção em butafenacil, o evento foi confirmado por análise de Southern como sendo homoplásmico para a inserção dos genes PPO e gus nos genomas dos cloroplastos. A atividade de GUS foi visualizada por ensaios padrão para GUS.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Syngenta Participations AG

Boudreau, Eric

Gu, Weining

De Framond, Anic

Heifetz, Peter

<120> Transformação de plastídeos

<130> 70149WOPCT

<140> PCT/US03/31941

<141> 2003-10-17

<150> 60/418596 <151> 2002-07-10

<160> 29

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 7652

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Vetor de transformação de plastídeos pEBPPot
(Exemplo 1 VII).

<400> 1

```

cttttgctct gcacggaaac taaaccatct ggagtcctcat atgttaagtt gtatcctccg      60
ctctccagct tagtgatacc taagagcttc caagacaact taactttgct acctaatctt      120
gcagatattg cttctggcaa cattcgaagt cccttcctga aagaaccaac tgtttgggcc      180
tgtggttttg gcaggcgcgg gtctcgttct gccttgggag cgtttttcct ctctgaatt      240
gccttaaaag taccacctat tatgcttcca ccattttgct ctagtttcca aaccttccca      300
aacgctgctt tcatgctcag ttttgaagga tcaccagcat aaacacctga acaaaacggt      360
tcaatcaggc gctcaaaaac ctcatacccg aggttacgcc gtacaaactc ctccacagat      420
tcttcacgac ctggagggtga cggtcgaatg ccaagtgcac caaaaccagc tctaattctc      480
ccaccaatac tcatcaaatc aaagaacggt aagtctgtta gcttcgatgg aaccggcctc      540
aatttcccat tccacaacac aaaccttggc gcagtaggat ctccaacac caaatcatcc      600
ttcaaaccac tatctaccac catagtgagc ataggatcag acggttgaaa actattggga      660
ccttcttccc agagaaaacc atttcttcca cgagtgataa tgttgcctcc aacacgatcc      720
ttagcctcgg tcacaattaa attcggagca gcatcaggat gcttagtagc aagcgcctga      780
gcgatgcaaa gaccactaat acctccgccg acaatcacac aatccatgaa tccttcctta      840
caactgattc ggaattgtct ttccttccaa ggataacttg tatccaggcg cttcagatta      900
ttagcctgga gttcgccacc agcagtatag ccaaccctac cctatcacgt caatcccaca      960
agcctcttat ccattcccgt tcgatcgtgg tgaattagct tctgcagtcg cactattacg     1020
gatatgaaaa taatgggtcaa aatcggattc aattgtcaac tgcccctatc ggaaatagga     1080

```

ttgactaccg attccgaagg aactggagtt acatctcttt tccattcaag agttcttatg	1140
cgtttccacg cccctttgag accccgaaaa atggacaaat tccttttctt aggaacacat	1200
acaagattcg tcaactacaaa aaggataatg gtaaccctac cattaactac ttcatttatg	1260
aatttcatag taatagaaat acatgtccta ccgagacaga atttggaact tgctatcctc	1320
ttgcctagca ggcaaagatt tacctccgtg gaaaggatga ttcattcggg tgcacatgag	1380
agtccaacta cattgccaga atccatgttg tatatttgaa agagggtgac ctcccttgctt	1440
ctctcatggt acactcctct tcccgcgag ccccttttct cctcgggtcca cagagacaaa	1500
atgtaggact ggtgccaaca attcatcaga ctactaagt cgggacact aactaatact	1560
aatctaatat aatagtctaa tataatctaat ataatagaaa atactaatat aatagaaaag	1620
aactgtcttt tctgtatact ttccccggtt ccgttgctac cgcggtgctt acgcaatcga	1680
tcggattaga tagatatccc ttcaacatag gtcacgaaa ggatctcggg gaccaccaa	1740
agtacgaaag ccaggatctt tcagaaaacg gattcctatt caaagagtgc ataaccgcat	1800
ggataagctc aactaaccg gtcaatttgg gatccaaatt cgagattttc cttgggaggt	1860
atcggaagg atttcgtacc caattcgccc tatagtgagt cgtattacaa ttcactggcc	1920
gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcggtt cccaacttaa tcgccttgca	1980
gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg ccgcaccga tcgcccttc	2040
caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgcgacgcg cctgtagcgg cgcattaagc	2100
gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgc	2160
gtccttttcg ctttcttccc ttcttttctc gccacgttcg ccggaattcg aatagatcta	2220
catacacctt ggttgacacg agtatataag tcatgttata ctgttgata acaagccttc	2280
cattttctat ttgatttgt agaaaactag tgtgcttggg agtcctgat gattaaataa	2340
accaagattt taccatgagg gaagcgggta tcgccgaagt atcgactcaa ctatcagagg	2400
tagttggcgt catcgagcgc catctcgaac cgacgttgct ggccgtacat ttgtacggct	2460
ccgcagtggg tggggcctg aagccacaca gtgatattga tttgctggtt acggtgaccg	2520
taaggcttga tgaaacaacg cggcgagctt tgatcaacga ctttttgga acttcggctt	2580
cccctggaga gagcgagatt ctccgcgctg tagaagtcac cattgttggtg cagcagaca	2640
tcattccgtg gcgttatcca gctaagcgcg aactgcaatt tggagaatgg cagcgcaatg	2700
acattcttgc aggtatcttc gagccagcca cgatcgacat tgatctgggt atcttgcgtg	2760
caaaagcaag agaacatagc gttgccttgg taggtccagc ggcgaggaa ctctttgatc	2820
cggttcctga acaggatcta tttgaggcgc taaatgaaac cttaacgcta tggaaactgc	2880
cgcccactg ggctggcgat gagcgaaatg tagtgcttac gttgtccgc atttggtaca	2940
gcgcagtaac cgcaaaatc gcgccgaagg atgtcgtgc cgactgggca atggagcgcc	3000
tgccggccca gtatcagccc gtcatacttg aagctagaca ggcttatctt ggacaagaag	3060
aagatcgctt ggcctcgcgc gcagatcagt tggagaatt tgtccactac gtgaaaggcg	3120

```

agatcaccaa ggtagtcggc aaataatgtc taacaattcg ttcaaactag aactagttag 3180
tgttagtcta aatctagttt agtaaaaaac gagcaatata agccttcttt aaataagaaa 3240
gagggcttat attactcgtt tttttctata aaaatgagca aatttttata gagtatcata 3300
ttttacttta ttatttatat taataataaa taataataat aaataataaa aaattactat 3360
atatttttta ttagaagctc cggttttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta 3420
gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggatgatgt 3480
tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtcacag 3540
ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat 3600
tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggtaaaaaa tgagctgatt 3660
taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt ttacaatttc ccagggtggca 3720
cttttcgggg aaatgtgcgc ggaaccctta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata 3780
tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatttga aaaaggaaga 3840
gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgcgc ttattccctt ttttgcgga ttttgccctc 3900
ctgtttttgc tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg 3960
cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc 4020
ccgaagaacg tttccaatg atgagcactt taaagtctt gctatgtggc gcggtattat 4080
cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact 4140
tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat 4200
tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga 4260
tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc 4320
ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga 4380
tgcttgtagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag 4440
cttcccgga acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc 4500
gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt 4560
ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct 4620
acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg 4680
cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagttaa ctcatatata ctttagattg 4740
atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca 4800
tgacaaaaat ccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga 4860
tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa 4920
aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga 4980
aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt 5040
taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg ctaatcctgt 5100
taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat 5160

```

agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacggggg ttcgtgcaca cagcccagct 5220
 tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca 5280
 cgcttcccga agggagaaa ggcggacagg atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag 5340
 agcgcacgag ggagcttcca gggggaacg cctgggtatct ttatagtcct gtcgggtttc 5400
 gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga 5460
 aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca 5520
 tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag 5580
 ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagttagc gaggaagcgg 5640
 aagagcggcc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct 5700
 ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagttagcg caacgcaatt aatgtgagtt 5760
 agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttggtg 5820
 gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc 5880
 tcgaaattaa ccctactaa agggaacaaa agctggagct ccaccgccgc gcccaatcat 5940
 tccggataac gcttgcatcc tctgtattac cgcggctgct ggacagagat tagccgatgc 6000
 ttattcccca gataccgtca ttgcttcttc tccgggaaaa gaagttcacg acccggtggc 6060
 cttctacctc cacgcggcat tgctccgtca ggctttcgcc cattgcggaa aattccccac 6120
 tgctgcctcc cgtaggagtc tgggccgtgt ctcagtccca gtgtggctga tcatcctctc 6180
 ggaccagcta ctgatcatcg ccttggttag ctattgcctc accaactagc taatcagacg 6240
 cgagccctc ctcgggaggga ttctcctttt tgctcctcag cctacggggg attagcagcc 6300
 gtttccagct gttgttcccc tcccaggggc aggttcttac gcgttactca cccgtccgcc 6360
 actggaaaca ccacttccc tccgacttgc atgtgttaag catgcccca gcgttcatcc 6420
 tgagccagga tcgaactctc catgagattc atagttagc tacttatagc ttccttggtc 6480
 gtagacaaa cggattcggg attgtctttc attccaaggc ataacttgta tccatgcgct 6540
 tcatattcgc ccggagttcg ctcccagaaa tatagccatc cctgccccct cacgtcaatc 6600
 ccacgagcct cttatccatt ctcatgaa gacggcgggg gagcaaatcc aactagaaaa 6660
 actcacattg ggcttaggga taatcaggct cgaactgatg acttccacca cgtcaagggtg 6720
 acactctacc gctgagttat atcccttccc cgccccatcg agaaatagaa ctgactaatc 6780
 ctaagtcaaa gggtcgagaa actcaacgcc actattcttg aacaacttg agccgggcct 6840
 tctttctgca gttcaatgga agcaatgata aaaaaatca aatagaaaag gaaagggagg 6900
 aaatacaaaa aaatagaaga gaaaagtcac acaaagttat atacaaatga ctacccccct 6960
 ttttgatttt ccttaattta tttccttaat tgaatttcgg ttgaactagt ctgggagatt 7020
 taatgtttta catttacttg taagcgtacc gtgacatgaa gttgttgacc tcaatcgcgg 7080
 tttcatatgc gccttctaca caccggccta aggctacacc agcgcgtaa ttgccacca 7140
 aaaatagccc ttcgtagccc gaagacgtta gagatgattt agccgtgtca aggatatcaa 7200

```

agtgaccaac tagaaactga ggaatggctt gagggccatac cctaactcct aatttaagtg 7260
gatcggtcga attaggetta attagcattt tcctcaaatac tctgtcaact gcttccacta 7320
actcaccttc agacttggac agaattccgg tgtttgtaga cccgccaatc atgttcaaca 7380
gcaaaattct tccgggcggt gcgcgatttg gaaagagtga ggagctgtag atagttccta 7440
atgtttcaac tccttgctg cgtaggatgca attgcccaaa accctttagt tcaccatcta 7500
tcaaacattc tgttcggatt gcttctttcg ggtacgagat agatactgct gcaactggtg 7560
ggtaatatag ttttgagagt gcatttgcag cagattcaga aagagggcgc aagagaccgc 7620
ttgcaacatg agatggcacc gtcattacaa ca 7652

```

<210> 2

<211> 8684

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Vetor de transformação de plastídeos pEB8 (= pEB8a) (Exemplo 2).

<400>

2

tttaactcga ttctattttac taatgtatca ccttcgaatt ttacttcagc tcttgtttta	60
taattaccat cacctttgaa gaagattggt ctttcttgta cgtaaccttc aggcattgct	120
gatttgaaga aatcatgttg tttcatatga tcaggatata ttgcgaaaca ttgtactcca	180
tatccgaatg ttgatactaa tgttgccaa ggtacaggta atttacctgt tgtacagatg	240
aattttaatg ttaatttacc atatgtagca tcaccttcac cttcacctga tactgagaat	300
ttatgaccat ttacatcacc atctaattct actaagatag gtactactcc agtgaataat	360
tcttcacctt ttgaagccat gaatccctcc ctacaactat ccaggcgctt cagattcgcc	420
cggagttcgc tcccagaaat atagccatcc ctgccccctc acgtcaatcc cacgagcctc	480
ttatccattc tcattgaacg acggcgaatt cgaatagatc tacatacacc ttgggtgaca	540
cgagtatata agtcatgtta tactgttgaa taacaagcct tccattttct attttgattt	600
gtagaaaact agtgtgcttg ggagtccctg atgattaaat aaaccaagat ttaccatgg	660
attgtgtgat tgcggcgga ggtatttagtg gtctttgcat cgctcaggcg cttgctacta	720
agcatcctga tgctgctccg aatttaattg tgaccgaggc taaggatcgt gttggaggca	780
acattatcac tcgtgaagag aatggttttc tctgggaaga aggtcccaat agttttcaac	840
cgtctgatcc tatgctcact atggtggtag atagtggttt gaaggatgat ttggtgttg	900
gagatcctac tgcgccaagg tttgtgtgtt ggaatgggaa attgaggccg gttccatcga	960
agctaacaga cttaccgttc tttgatttga tgagtattgg tgggaagatt agagctggtt	1020
ttggtgcact tggcattcga ccgtcacctc caggctcgtga agaactctgtg gaggagtgtg	1080
tacggcgtaa cctcgggtgat gaggtttttg agcgctgat tgaaccgttt tgttcagggtg	1140
tttatgctgg tgatccttca aaactgagca tgaaagcagc gtttgggaag gtttggaaac	1200
tagagcaaaa tggtggaagc ataatagggtg gtacttttaa ggcaattcag gagaggaaaa	1260

acgctcccaa ggcagaacga gacccgcgcc tgccaaaacc acagggccaa acagttaggtt 1320
 ctttcaggaa gggacttcga atgttgccag aagcaatata tgcaagatta ggtagcaaag 1380
 ttaagtgtc ttggaagctc ttaggtatca ctaagctgga gagcggagga tacaacttaa 1440
 catatgagac tccagatggg ttagtttccg tgcaagcaa aagtgttgta atgacgggtg 1500
 catctcatgt tgcaagcggg ctcttcgcc ctctttctga atctgctgca aatgcactct 1560
 caaaactata ttaccacca gttgcagcag tatctatctc gtaccgaaa gaagcaatcc 1620
 gaacagaatg tttgatagat ggtgaactaa agggtttttg gcaattgcat ccacgcacgc 1680
 aaggagttag aacattagga actatctaca gctcctcact ctttccaaat cgcgcaccgc 1740
 ccggaagaat tttgctgttg aacatgattg gcgggtctac aaacaccgga attctgtcca 1800
 agtctgaagg tgagttagtg gaagcagttg acagagattt gagggaaatg ctaattaagc 1860
 ctaattcgac cgatccactt aaattaggag ttagggtatg gcctcaagcc attcctcagt 1920
 ttctagttag tcactttgat atccttgaca cggctaaatc atctctaacg tcttcgggct 1980
 acgaagggct atttttgggt ggcaattacg tcgctgggtg agccttaggc cgggtgttag 2040
 aaggcgcata tgaaaccgcg attgaggta acaacttcat gtcacggtag gcttacaagt 2100
 aaatgtaaaa cattaaatct cccagactag ttcaaccgaa attcaattaa ggaaataaat 2160
 taaggaaata caaaaagggg ggtagtcatt tgtatataac tttgtatgac ttttctcttc 2220
 tatttttttg tatttcctcc ctttcctttt ctatttgtat ttttttatca ttgcttccat 2280
 tgaactgcag aaagaaggcc cggctccaag ttgttcaaga atagtggcgt tgagtttctc 2340
 gaccttttga cttaggatta gtcagttcta tttctcgatg gggcggggaa gggatataac 2400
 tcagcggtag agtgtcacct tgacgtggg gaagtcacat gttcgagcct gattatccct 2460
 aagcccaatg tgagtttttc tagttggatt tgctcccccg ccgtcgttca atgagaatgg 2520
 ataagaggct cgtgggattg acgtgagggg gcagggatgg ctatatcttct gggagcgaac 2580
 tccgggcgaa tatgaagcgc atggatacaa gttatgcctt ggaatgaaag acaattccga 2640
 atccgctttg tctacgaaca aggaagctat aagtaatgca actatgaatc tcatggagag 2700
 ttcgatcctg gtcaggatg aacgtggcg gcatgcttaa cacatgcaag tcggacggga 2760
 agtgggtgtt ccagtggcgg acgggtgagt aacgcgtaag aacctgccct tgggagggga 2820
 acaacagctg gaaacggctg ctaatacccc gtaggctgag gagcaaaagg aggaatccgc 2880
 ccgaggaggg gctcgcgtct gattagctag ttgggtaggc aatagcttac caaggcgatg 2940
 atcagtagct ggtccgagag gatgatcagc cacttgagg ctgagacacg gccagactc 3000
 ctacgggagg cagcagtggg gaattttccg caatgggcga aagcctgacg gagcaatgcc 3060
 gcgtggaggt agaaggccca cgggtcgtga acttcttttc ccggagaaga agcaatgacg 3120
 gtatctgggg aataagcatc ggctaactct gtgccagcag ccgcggtaat acagaggatg 3180
 caagcgttat ccggaatgat tgggcgcggc ggtggagctc cagcttttgt tcccttagt 3240
 gagggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt 3300

atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg	3360
cctaagtagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg	3420
gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc	3480
gtattgggct ctcttcgctt tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggtgc	3540
ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata	3600
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg	3660
cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgt	3720
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa	3780
gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggataacct tccgcctttc	3840
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt	3900
aggctggtcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg	3960
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta tcgccactgg	4020
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgtt aggcggtgct acagagtctt	4080
tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc	4140
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg	4200
ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc	4260
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt	4320
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa	4380
aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat	4440
gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcattc atagtgcct	4500
gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggcct accatctggc cccagtgtg	4560
caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag	4620
ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgctccatc cagtctatta	4680
attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcg aacgttggtg	4740
ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg	4800
gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct	4860
ccttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggtatca ctcatggta	4920
tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg	4980
gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc	5040
cgcgctcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg	5100
gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga	5160
tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg	5220
ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat	5280
gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catatatcag ggttattgtc	5340

tcatgagcgg	atacatat	gaatgtat	agaaaaata	acaaatagg	gttccgcgca	5400
catttccccg	aaaagtgcc	cctgggaa	tgtaaactg	aatattttg	taaaattcgc	5460
gttaaat	tgtaaatca	gctcatt	taaccaatag	gccgaaatcg	gcaaaatccc	5520
ttataaatca	aaagaataga	ccgagatag	gttgagtgt	gttccagttt	ggaacaagag	5580
tccactatta	aagaacgtg	actccaact	caaagggcg	aaaaccgtct	atcagggcg	5640
tggcccacta	cgtgaacat	caccctaact	aagttttttg	gggtcgaggt	gccgtaaagc	5700
actaaatcgg	aaccctaaag	ggagccccg	atthagagct	tgacggggaa	agccgggttc	5760
aatggaagca	atgataaaaa	aatacaata	gaaaaggaaa	gggaggaaat	acaaaaaat	5820
agaagagaaa	agtcatacaa	agttatatac	aaatgactac	ccccctttt	gtatttcctt	5880
aatttatttc	cttaattgaa	tttcggttga	actagtttga	acgaattgtt	agacattatt	5940
tgccgactac	cttgggtgatc	tcgcctttca	cgtagtgga	aaattcttcc	aactgatctg	6000
cgcgcgaggc	caagcgatct	tcttcttgct	caagataagc	ctgtctagct	tcaagtatga	6060
cgggctgata	ctgggcccgc	aggcgctcca	ttgccagtc	ggcagcgaca	tccttcggcg	6120
cgattttgcc	ggttactgcg	ctgtaccaa	tgccgggaca	cgtaagcact	acatttcgct	6180
catcgccagc	ccagtcgggc	ggcgagttcc	atagcgtaa	ggtttcattt	agcgcccaa	6240
atagatcctg	ttcaggaacc	ggatcaaaga	gttcctccgc	cgctggacct	accaaggcaa	6300
cgctatgttc	tcttgctttt	gtcagcaaga	tagccagatc	aatgtcgatc	gtggctggct	6360
cgaagatacc	tgcaagaatg	tcattgcgct	gccattctcc	aaattgcagt	tcgcgcttag	6420
ctggataacg	ccacggaatg	atgtcgctgt	gcacaacaat	ggtgacttct	acagcgcgga	6480
gaatctcgct	ctctccagg	gaagccgaag	tttccaaaag	gtcgttgatc	aaagctcgcc	6540
gcgttgtttc	atcaagcctt	acggtcaccc	taaccagcaa	atcaatatca	ctgtgtggct	6600
tcaggccgcc	atccactgcg	gagccgtaca	aatgtacggc	cagcaacgtc	ggttcgagat	6660
ggcgctcgat	gacgccaa	acctctgata	gttgagtcga	tacttcggcg	atcaccgctt	6720
ccctcatggt	aaatgaaaga	aagaactaaa	tactatattt	cactttgagg	tggaacgta	6780
acaatttttt	ttattgtctt	tataatattc	atattggttt	ttatcgattt	tattttatcc	6840
atagattata	aaaattcata	aagaaagaca	gaatgaataa	actcaaatta	ttacgaatag	6900
gtctttctaa	tgataaataa	gtatgaattc	cggcgaacgt	ggcgagaaag	gaagggaaga	6960
aagcgaaagg	agcgggctg	agggcgctgg	caagtgtagc	ggtcacgctg	cgcgtaacca	7020
ccacaccgcg	cgcgctta	gcgccgtac	agggcgctgc	gcgccattcg	ccattcaggc	7080
tgcgcaactg	ttgggaaggg	cgatcgggtc	gggcctcttc	gctattacgc	cagctggcga	7140
aagggggatg	tgctgcaagg	cgattaagtt	gggtaacgcc	agggttttcc	cagtcacgac	7200
gttgtaaaac	gacggccagt	gaattgta	acgactcact	atagggcgaa	ttgggtacga	7260
aatcttccc	gatacctccc	aaggaaaatc	tcgaatttgg	atcccaaatt	gacgggtag	7320
tgtgagctta	tccatgcggt	tatgcactct	ttgaatagga	atccgttttc	tgaaagatcc	7380

tggctttcgt acttttggtgg gtctccgaga tcctttcgat gacctatggt gaagggatat	7440
ctatctaatac cgatcgattg cgtaaagccc gcggtagcaa cggaaccggg gaaagtatac	7500
agaaaagaca gttcttttct attatattag tattttctat tatattagat atattagact	7560
attatattag attagtatta gttagtgatc ccgacttagt gagtctgatg aattgttggc	7620
accagtccta ctttttgtct ctgtggaccg aggagaaaag gggctcggcg ggaagaggag	7680
tgtacatga gagaagcaag gaggtcaacc tctttcaaata atacaacatg gattctggca	7740
atgtagttag actctcatgt cgatccgaat gaatcatcct ttccacggag gtaaatactt	7800
gcctgctagg caagaggata gcaagttcca aattctgtct cggtaggaca tgtatttcta	7860
ttactatgaa attcataaat gaagtagtta atggtagggg taccattatc cttttttag	7920
tgacgaatct tgtatgtgtt cctaagaaaa ggaatttgtc ctttttcgg ggtctcaag	7980
gggcgtggaa acgcataaga actcttgaat ggaaaagaga tgtaactcca gttccttcgg	8040
aatcggtagt caatcctatt tccgataggg gcagttgaca attgaatccg attttgacca	8100
ttattttcat atccgtaata gtgcgactgc agaagcttct aataaaaaat atatagtaat	8160
tttttattat ttattattat tttttattat taatataata aataaagtaa aatatgatac	8220
tctataaaaa tttgctcatt tttatagaaa aaaacgagta atataagccc tctttcttat	8280
ttaaagaagg cttatattgc tcgtttttta ctaaactaga tttagactaa cactaactag	8340
acccttattt atataattca tccataccat gtgtgatacc agcagctgtt acaaattcta	8400
ataataccat atgatctctt ttttcattag gatcttttga taaagctgat tgtgtacct	8460
agtaatgatt atcaggtaat aatacaggac catcaccgat aggtgtattt tgttgataat	8520
gatctgctaa ttgtactgaa ccgtcttcga tattatgtct gattttgaaa tttactttga	8580
taccattttt ttgtttatca gccatgatat atacattatg tgaattataa ttatattcta	8640
atttatgacc taagatatta ccatcttctt tgaaatcgat acct	8684

<210> 3

<211> 10453

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Vetor de transformação de plastídeos pNY2C
(Exemplo 4 II).

<400>

3

ctcgagtgag agaaagaagt gaggaatcct cttttcgact ctgactctcc cactccagtc	60
gttgcttttc tttctgttac ttcgaaagta gctgcttcag cttcagccac tcgaattttc	120
gatattcctt tttatttctc atcaaacgaa tggcatcttc ttctggaaat cctagctatt	180
cttagcatga tattgggaaa tctcattgct attactcaa caagcatgaa acgtatgctt	240
gcatattcgt ccataggcca aatcggatat gtaattattg gaataattgt tggagactca	300
aatgatggat atgcaagcat gataacttat atgctgttct atatctccat gaatctagga	360
acttttgctt gcattgtatt atttggtcta cgtaccggaa ctgataacat tcgagattat	420

gcaggattat acacaaaaga tccttttttg gctctctctt tagccctatg tctcttatcc 480
 ctaggaggtc ttctccact agcaggtttt ttcggaaaac tctatttatt ctggtgtgga 540
 tggcaggcag gcctatattt cttggtttta ataggactcc ttacaagcgt tgtttctatc 600
 tactattatc taaaaataat aaagttatta atgactggac gaaaccaaga aataaccctt 660
 cacgtgcgaa attatagaag atccccctta agatcaaaca attccatcga attgagtatg 720
 attgtatgtg tgatagcatc tactatacca ggaatatcaa tgaaccaat tattgcaatt 780
 gctcaggata gcctttttta gcttctaggg tctatttctt agttcaagat cctcttact 840
 aactggaatc aaagaattag tagatctgtt ccgccccaaa tgggaatggg ctagggttat 900
 gaacttataa tctgatgatc gagtcgattc catgattata agttcattcc ataccggacc 960
 aggccggaat agggttatat acattctcat tatgagaagg ggtcattcgg gcctatctaa 1020
 atagatacta tgtttacata gttcaatgga agcaatgata aaaaaatca aatagaaaag 1080
 gaaagggagg aaatacaaaa aaatagaaga gaaaagtcac acaaagttat atacaaatga 1140
 ctacccccct ttttgtattt ccttaattta tttccttaat tgaatttcgg ttgaactagt 1200
 ctgggagatt taatgtttta catttacttg taagcgtaac gtgacatgaa gttgttgacc 1260
 tcaatcgagg tttcatatgc gccttctaca caccggccta aggctacacc agcgacgtaa 1320
 ttgccacca aaaaatagccc ttcgtagccc gaagacgtta gagatgattt agccgtgtca 1380
 aggatataca agtgaccaac tagaaactga ggaatggctt gaggccatac cctaactcct 1440
 aatttaagtg gatcggtcga attaggctta attagcattt tcctcaaac tctgtcaact 1500
 gcttccacta actcaccttc agacttggac agaattccgg tgtttgtaga cccgccaatc 1560
 atgttcaaca gcaaaattct tccgggcggg gcgcgatttg gaaagagtga ggagctgtag 1620
 atagttccta atgtttcaac tccttgcgtg cgtggatgca attgccccaa accctttagt 1680
 tcaccatcta tcaaacattc tgttcggatt gcttctttcg ggtacgagat agatactgct 1740
 gcaactgggt ggtaatatag ttttgagagt gcatttgacg cagattcaga aagagggcgc 1800
 aagagaccgc ttgcaacatg agatggcacc gtcattacaa cacttttgct ctgcacggaa 1860
 actaaacat ctggagtctc atatgttaag ttgtatcctc cgctctccag cttagtata 1920
 cctaagagct tccaagacaa cttaactttg ctacctaac ttgcagatat tgcctctggc 1980
 aacattcgaa gtcccttcct gaaagaacca actgtttggc cctgtgggtt tggcaggcgc 2040
 gggctctggt ctgccttggg agcgtttttc ctctcctgaa ttgccttaaa agtaccacct 2100
 attatgcttc caccattttg ctctagtttc caaaccttcc caaacgctgc tttcatgctc 2160
 agttttgaag gatcaccagc ataaacacct gaacaaaacg gttcaatcag gcgctcaaaa 2220
 acctcatcac cgaggttacg ccgtacaaac tcctccacag attcttcacg acctggagggt 2280
 gacggtcgaa tgccaagtgc accaaaacca gctctaactt tcccaccaat actcatcaaa 2340
 tcaagaacg gtaagtctgt tagcttcgat ggaaccggcc tcaatttccc attccacaac 2400
 acaaaccttg gcgcagtagg atctcccaac accaaatcat ctttcaaacc actatctacc 2460

accatagtga gcataggatc agacggttga aaactattgg gaccttcttc ccagagaaaa	2520
ccattctctt cagcagtgat aatgttgcct ccaacacgat ccttagcctc ggtcacaatt	2580
aaattcggag cagcatcagg atgcttagta gcaagcgctt gagcgatgca aagaccacta	2640
atacctccgc cgacaatcac acaatccatg aatccctccc tacaactgat tcggaattgt	2700
ctttccttcc aaggataact tgtatccagg cgcttcagat tatttagcctg gagttcgcca	2760
ccagcagtat agccaaccct accctatcac gtcaatccca caagcctctt atccattccc	2820
gttcgatcgt ggtgaattag cttctatgga ttctacatc attacattcc atttaggatt	2880
aggaatacgc gtaatcggac ctgcttttta catatctcta ttgggaccct attcacctct	2940
ttgagtgaat cgagaaatag gtttgattgt ccatcttttt gatatatatc aggcattgca	3000
ttctccggat aattcaaacc gaagcaattg gatgtccaac tcgggcctat atgacatgac	3060
cgatcaatag atccaccttt gtcatatatt ccatacatca cactagatag atatcatatt	3120
catggaatac gattcacttt caagatgcct tgggtggtgaa atggtagaca cgcgagactc	3180
aaaatctcgt gctaaatagc gtggagggtc gagtcctctt caaggcataa tattgagaat	3240
gctcattgaa tgagcattct caataagaga gctcggatcg aatcgggtatt gatataccga	3300
ttcgatccga gctcttgtaa ttggaataaa ttcggcagcg gatcgcgaaa tcttggtgat	3360
cttctctatc taatgaatgg ggagtccgct taaaatcgt ccgacctgca cccaccccc	3420
gagtatatgc ttcaacagga atcacacaag ggtagattag aaacctctgg taaaatgccc	3480
gcccgtaac cagcagataa agtacattac atagtccagg gattggcgac ttaccattc	3540
agtgactttg gcaactggacg ttcccaaaat ggggactatc gggtaaattc aatataatag	3600
acgcctgttg gcatccagc cttccttctc ctttcagggc ctatccgaaa gagaatccag	3660
tacttcttgg tcgtgaatat ctgaactggt tgtttgctgt tcaagaattc ttgtttaggc	3720
agttcatacc atccatacat agtggtttga tctaagattt caattcttcc gtgtttcagc	3780
agtaacatat tcttccatgg agctaaggtc caaaatatgg aagaaacaag cgtttccacg	3840
actctaccac ccagtcaatt ctgttccact taatccctct ttcattggcca catatctttc	3900
cggctaagga atgggaaatc tttctcctgt tacatgaatc caattttcat ttcattccggg	3960
aaaagccatc tttttctcaa caatgtcttt gtcatttgat ccaatagcgt tccgttagat	4020
aggaacagat ttgataaata ctgataactc tcggatagag tattagaacg gaaagatcca	4080
ttagataaatg aactgttggg tctaagccat ctctgacgat taatcaacaa ttcgaagtgc	4140
ttttcttgcg tattcttgat aaaccagcgt ttatatatag atgtaggagg gtctgtttgg	4200
gaagtaagaa gccccttga catctcttca tctgcaaata attctcgatg tgaaaacaca	4260
gagccagggg gctgatcttt gaataggaaa aagagtggat caattcgaat agatctacat	4320
acaccttggt tgacacgagt atataagtca tggtatactg ttgaataaca agccttccat	4380
tttctatttt gatttgtaga aaactagtgt gcttgggagt ccctgatgat taaataaacc	4440
aagattttac catgagggaa gcggtgatcg ccgaagtatc gactcaacta tcagaggtag	4500

```

ttggcgcat cgagcgccat ctcgaaccga cgttgctggc cgtacatttg tacggctccg 4560
cagtggatgg cggcctgaag ccacacagtg atattgattt gctggttacg gtgaccgtaa 4620
ggcttgatga aacaacgcgg cgagctttga tcaacgacct tttggaaact tcggcttccc 4680
ctggagagag cgagattctc cgcgctgtag aagtcacat tgttgtgcac gacgacatca 4740
ttccgtggcg ttatccagct aagcgcgaac tgcaatttgg agaattggcag cgcaatgaca 4800
ttcttgagg tatcttcgag ccagccacga tcgacattga tctggctatc ttgtgacaa 4860
aagcaagaga acatagcgtt gccttggtag gtccagcggc ggaggaaactc tttgatccgg 4920
ttcctgaaca ggatctattt gaggcgctaa atgaaacctt aacgctatgg aactcgcgcg 4980
ccgactgggc tggcgatgag cgaaatgtag tgcttacgtt gtcccgcat tggtagcgg 5040
cagtaaccgg caaatcgcg ccgaaggatg tcgctgccga ctgggcaatg gagcgcctgc 5100
cggccagta tcagcccgtc atacttgaag ctgacaggc ttatcttga caagaagaag 5160
atcgcttggc ctcgcgcgca gatcagttgg aagaatttgt ccactacgtg aaaggcgaga 5220
tcaccaaggt agtcggcaaa taatgtctaa caattcgttc aaactagaac tagttagtgt 5280
tagtctaaat ctagtttagt aaaaaacgag caatataagc cttctttaa taagaagag 5340
ggcttatatt actcgttttt ttctataaaa atgagcaaat ttttatagag tatcatattt 5400
tactttattt attatattaa taataataaa taataataaa taataaaaaa ttactatata 5460
ttttttatta gaagctgggt cccaaatgaa ttggcttatt cgaaaaaggc cttgttcttt 5520
ggaagatcta tctcgtgtct ggtactgcat ggttcactc tgcaagaact ccgaatcatt 5580
ctctgaagc tcatcctctt catcataaat gatccgcttg ccccgaaatg acctggacca 5640
atagggaaat cccaattcat tgggcctttc gatacaatca aatagaaagc cccaagggcg 5700
ccatattcta ggagcccaaa ctatgtgatt gaataaatcc tcctgcgggt caagggctcc 5760
ttctccctcc ctttcttcaa actccgattc atatttttca tagagaaatc tctgatcaag 5820
gatagaacaa gagccgtttt gcatcatatc taagggatc ctcggttcgg gccgaagaag 5880
caatgtcact cgatcattat caaactgact gcaatctttt tctgtccgtg aagatccac 5940
cagagcgct tctacttcta ataggccatg aactagatca gaatcattct caacgagtcc 6000
ataagaagt atccattttt tttcatcggg tccggataaa gaccaaagat cttgagcgac 6060
cgatccggca gaacaactca aaagataaag aagtatcgtt aatctcttca tgctcgttcc 6120
aagctcgaag taccatttgt acaaataaga atccccttcg ttacatgatt tcttcttcat 6180
atagatagat ataggatcta tggggcaatt acttagaagt acattttgtg ctacagccct 6240
tcctatctga tagaaaagga tcccatgac ctgaaccgat cttacctggg atcgcaaact 6300
ccaagtttgt ctatgaagag cggatcta atgtattagt tctataattg atttcttctg 6360
tgtaatacta atcgatagga cctcattggt aagtgtaca agatctcgtg cattggaacc 6420
catggttatg gaccgaatc cgttagtatg gaacattttc tttccaagt gaaatccct 6480
agtatatgaa agagtgaaaa agtgctttcg ttgttggtga agaagaagcc ttcgtatctt 6540

```

aatgcacgta ttttaatttat tcggagctat tagagcggga tccacttttt ggggaatatg 6600
 agtcgaagca .ataacaagaa tttttctagt agaacatctt tcacaatccc tggagagatg 6660
 gttcactaat agaccgaggg ctaagtcatt cgactcattc acatccagat catgaatgtt 6720
 tggaatccat attatgcaag gagacattgc ttttgctaatt tcgaattgaa gggatgata 6780
 aaatcggctt atttccggca tcatatccat agttagccca ttcacccatg ttagcagttt 6840
 cagctccgta tcaaggtcac gatcgatatt gtcactagca tcaagattgt cactatcatt 6900
 aatatcgtca ctatcatcaa tatcgatctc atcaagaaga aaacctttag gcttggtatt 6960
 caggaacttg ttcagaaata ccgtaatgaa aggaacatag gagtttgctg ctagggtatt 7020
 gaccaaatag gatcggtccg ttcctataga acctatcact aaaatacccc tagaggggga 7080
 taaggctaag cggagcgaaa aggggtttcc atgagatggg aaatgaaaac tttttcccc 7140
 acacgaagtt tgtgaataag tgattgtctg ataattgagca aggaatatcc gtctttctgc 7200
 taaacaggat ggattgaact cataattcat tagatgcttt ttatgaatgt caactaagta 7260
 tcgtaagtaa attgctcccg gttgttcaat catttgataa ccagagtcatt tctttgataa 7320
 acgatcacta tgagtcagac tcaatagaat ttgatcaatc ctattttctg tcgttaagggt 7380
 ggagaactga accaagaatt ctctttcttc atcatcaatc gaatcactgt tcgagaccca 7440
 ggattctatt ttatcatcaa tccaatcccc gttcacgttt tttctttttc ttatcaatga 7500
 atagatctct ttacttgatg gacttagatg tctcgtatct ctcgaaaaag tgattcgatt 7560
 gatgggattt ggtatgagat cgatgatctc gatgagattg atattccaat ctttcttctt 7620
 agaacgtatt gatttgaccc cataagcggg accaagcatg ttgccgccag aagcagaacc 7680
 ccgtattttt tctagatacc taggtgagct ctgggtaccct ctagtcaagg ccttaagtga 7740
 gtcgtattac ggactggccg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcggtac 7800
 ccaacttaat cgccttgacg cacatcccc ttcgccgagc tggcgtaata gcgaagaggc 7860
 ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgctg cagcctgaat ggcgaaatggc gcttcgcttg 7920
 gtaataaagc ccgcttcggc gggctttttt ttgttaacta cgtcaggtgg cacttttcgg 7980
 ggaaatgtgc gcggaacccc tatttggtta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg 8040
 ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt 8100
 attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc tttttgctgg cattttgcct tcctgttttt 8160
 gctcaccag aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg 8220
 ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg cccgaagaa 8280
 cgttctcaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccggtgt 8340
 gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctgagaatga cttggttgag 8400
 tactcaccag tcacagaaaa gcattcttac gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 8460
 gctgccataa ccatgagtgta taactctgcg gccaaattac ttctgacaac gatcggagga 8520
 ccgaaggagc taaccgcttt ttgacacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt 8580

```

tggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta 8640
gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccg 8700
caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc 8760
cttccggtcg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcgg 8820
atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg 8880
gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg 8940
attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttacc 9000
cggttgataa tcagaaaagc cccaaaaaca ggaagattgt ataagcaa atttaaattg 9060
taaacgttaa tattttgtta aaattcgcgt taaatttttg ttaaatcagc tcatttttta 9120
accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagccg gagataggg 9180
tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca 9240
aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca cccaaatcaa 9300
gttttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa ccctaaaggg agccccgat 9360
ttagagcttg acggggaaag cgaacgtggc gagaaaggaa gggaagaaag cgaaaggagc 9420
gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggc cagcgtgcgc gtaaccacca cccccccg 9480
gcttaatgcg ccgctacagg gcgctgtaaa ggaatctagg gaagatcctt tttgataatc 9540
tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 9600
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaacia 9660
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc 9720
cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt 9780
agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaattc 9840
tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 9900
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 9960
gcttggagcg aacgacctac accgaactga gataacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 10020
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggg aagcggcagg gtcggaacag 10080
gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 10140
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat 10200
ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttctctgg cttttgctgg cttttgctc 10260
acatgtaatg tgagttagct cactcattag gcaccccgag ctttacctt tatgcttccg 10320
gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac 10380
catgattacg ccaagctacg taatacgact cactagtggg cagatcttcg aatgcatcgc 10440
gcgcaccgta cgt 10453

```

<210> 4

<211> 173

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de ADN do promotor do gene 16s PEP-NEP rRNA de plastídeo do milho, ligado ao local de ligação ao ribossoma (RBS) rbcL de plastídeo de N. tabacum.

<400> 4

gaattcacca cgatcgaacg ggaatggata agaggcttgt gggattgacg tgatagggta	60
gggttggcta tactgctggt ggcgaactcc aggctaataa tctgaagcgc ctggatacaa	120
gttatccttg gaaggaaaga caattccgaa tcagttgtag ggagggattc atg	173

<210> 5

<211> 34

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer superior para amplificação do promotor do gene 16s PEP-NEP rRNA do ADN de plastídeo do milho, o primer compreendendo um local de restrição para EcoRI (Exemplo 1 I).

<400> 5

gccagaattc accacgatcg aacgggaatg gata	34
--	-----------

<210> 6

<211> 77

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer inferior compreendendo um local de restrição para BspHI (Exemplo 1 I)

<400> 6

g⁻ccg⁻tc⁻atga atccctccct acaactgatt cggaattg⁻tc tttccttcca aggataactt 60
gtatccaggc gcttcag 77

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer superior para amplificação do gene ppo de
A. thaliana (Exemplo 1 II).

<400> 7

ccacgcacgc aaggagttga 20

<210> 8

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer inferior para amplificação do gene ppo de
A. thaliana, o primer compreendendo um local de
restrição para speI (Exemplo 1 II).

<400> 8

cgttactagt ctgggagatt taatgtt 27

<210> 9

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer superior para amplificação do promotor do gene psbA de *N. tabacum*, o primer compreendendo um local de restrição para EcoRI (Exemplo 1 III).

<400> 9

ttaagaattc gaatagatct acata 25

<210> 10

<211> 22

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer para a cadeia superior para a amplificação do promotor do gene psbA de *N. tabacum*, o primer compreendendo um local de restrição para NcoI (Exemplo 1 III).

<400> 10

cagccatggg aaaatcctgg tt 22

<210> 11

<211> 30

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer superior para amplificação do promotor do gene cIpP de *A. thaliana*, o primer compreendendo um local de restrição para EcoRI (Exemplo 1 V).

<400> 11

gcggaattca tcattcagaa gcccgttcgt 30

<210> 12

<211> 28

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer inferior para amplificação do promotor do gene cIpP de *A. thaliana*, o primer compreendendo um local de restrição para BspHI (Exemplo 1 V).

<400> 12

gcgtcatgaa atgaaagaaa aagagaat 28

<210> 13

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer superior para amplificação de um novo locus alvo de plastídeo, o primer compreendendo um local de restrição para XhoI (Exemplo 4 I).

<400> 13

agttatctcg agtgagagaa agaagtgagg aat 33

<210> 14

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer inferior para amplificação de um novo

locus alvo de plastídeo, o primer compreendendo um local de restrição para XbaI (Exemplo 4 I).

<400> 14

ttctctagaa gaaatacggg g 21

<210> 15

<211> 79

<212> ADN

<213> Bacteriófago X2 de Staphylococcus aureus

<400> 15

gttaaagaat gtagctgact gcatacttaa accaccata ctagttgctg ggtgggtttt 60
atgttataat ataaatgtg 79

<210> 16

<211> 110

<212> ADN

<213> Bacteriófago kvp1 de Kluyvera

<400> 16

tctagagaca ttacgttctc cccttgagtg atacacaatg agaaccaact cgtttcaagt 60
agtacctcac ataacttatc ttttaaatca acagaaggag attcaccatg 110

<210> 17

<211> 97

<212> ADN

<213> Bacteriófago T3

<400> 17

tctagagggga gacctcatct ttgaaatgag cgatgactaa aggttggagt cctttggttt 60
ccctttatct ttaataactt aggagattta attcatg 97

<210> 18

<211> 194

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> 5'UTR de promotor X2 e gene 10 de kvpi
quimérico.

<220>

<221> características diversas

<222> (1)..(194)

<400> 18

aattcgttaa agaatgtagc tgactgcata cttaaaccac ccatactagt tgctgggtgg	60
tttttatggtt ataataataa tgtgtctaga gacattacgt tctccccttg agtgatacac	120
aatgagaacc aactcgtttc aagtagtacc tcacataact tatcttttaa atcaacagaa	180
ggagattcac catg	194

<210> 19

<211> 10011

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Plasmídeo PEB10

<400> 19

agcttctaata	aaaaaatata	tagtaatttt	ttattattta	ttattattat	ttattattaa	60
tataataaat	aaagtaaaat	atgatactct	ataaaaattt	gctcattttt	atagaaaaaa	120
acgagtaata	taagccctct	ttcttattta	aagaaggctt	atattgctcg	ttttttacta	180
aactagattt	agactaacac	taactagttc	tagagcaatt	cccgaggctg	tagccgacga	240
tgggtgcgcca	ggagagttgt	tgattcattg	tttgccctccc	tgctgcgggt	tttcaccgaa	300
gttcattgcca	gtccagcggt	tttgacgcag	aaaagccgcc	gacttcgggt	tgcggtcgcg	360
agtgaagatc	cctttcttgt	taccgccaac	gcgcaatatg	ccttgcgagg	tcgcaaaatc	420
ggcgaaattc	catacctgtt	caccgacgac	ggcgctgacg	cgatcaaaga	cgcggtgata	480
catatccagc	catgcacact	gatactcttc	actccacatg	tcggtgtaca	ttgagtgcag	540
cccggtctaac	gtatccacgc	cgtattcggt	gatgataatc	ggctgatgca	gtttctcctg	600
ccaggccaga	agttcttttt	ccagtacctt	ctctgccggt	tccaaatcgc	cgctttggac	660
ataccatccg	taataacggt	tcaggcacag	cacatcaaag	agatcgctga	tggtatcggt	720
gtgagcgctg	cagaacatta	cattgacgca	ggtgatcgga	cgcgtcgggt	cgagtttacg	780
cgttgcttcc	gccagtggcg	cgaaatattc	ccgtgcacct	tgcggaacggg	tatccggttc	840
gttggaata	ctccacatca	ccacgcttgg	gtggtttttg	tcacgcgcta	tcagctcttt	900
aatcgctgt	aagtgcgctt	gctgagtttc	cccgttgact	gcctcttcgc	tgtacagttc	960
tttcggcttg	ttgcccgtt	cgaaaccaat	gcctaaagag	aggttaaagc	cgacagcagc	1020
agtttcatca	atcaccacga	tgccatgttc	atctgccag	tcgagcatct	cttcagcgta	1080
agggtaatgc	gaggtacggt	aggagttggc	cccaatccag	tccattaatg	cgtggtcgtg	1140
caccatcagc	acgttatcga	atcctttgcc	acgcaagtcc	gcattctcat	gacgaccaa	1200
gccagtaaag	tagaacggtt	tgtggttaat	caggaactgt	tcgcccttca	ctgccactga	1260
ccggatgccg	acgcgaagcg	ggtagatata	acactctgtc	tggtttttgg	ctgtgacgca	1320
cagttcatag	agataacctt	caccgggttg	ccagagggtg	ggattcacca	cttgcaaaagt	1380
cccgttagtg	ccttgtccag	ttgcaaccac	ctgttgatcc	gcatacgcga	gttcaacgct	1440
gacatcacca	ttggccacca	cctgccagtc	aacagacgcg	tggttacagt	cttgcgcgac	1500
atgcgtcacc	acggtgatata	cgtccaccca	ggtgttcggc	gtggtgtaga	gcattacgct	1560
gcgatggatc	ccggcatagt	taaagaaatc	atggaagtaa	gactgctttt	tcttgccggt	1620
ttcgtcggtg	atcaccattc	ccggcgggat	agtctgccag	ttcagttcgt	tgttcacaca	1680
aacggtgata	cgtacacttt	tcccggcaat	aacatacggc	gtgacatcgg	cttcaaatgg	1740

cgtatagccg ccctgatgct ccatcacttc ctgattattg acccacactt tgccgtaatg 1800
 agtgaccgca tcgaaacgca gcacgatacg ctggcctgcc caacctttcg gtataaagac 1860
 ttcgcgctga taccagacgt tgcccgcata attacgaata tctgcatcgg cgaactgac 1920
 gttaaaactg cctggcacag caattgcccg gctttcttgt aacgcgcttt cccaccaacg 1980
 ctgatcaatt ccacagtttt cgcgatccag actgaatgcc cacaggccgt cgagtttttt 2040
 gatttcacgg gttggggttt ctacaggacg gaccatggat taaatctcct aagttattaa 2100
 agataaaggg aaaccaaagg actccaacct ttagtcatcg ctcatattca agatgaggtc 2160
 tccctctacc cgggaagaga ttcggaattg tctttccttc caaggataac ttgtatccag 2220
 gcgcttcaga ttattagcct ggagttcgcc accagcagta tagccaaccc taccctatca 2280
 cgtcaatccc acaagcctct tatccattcc cgctcgatcg tggatgaattc gaatagatct 2340
 attcgaattc gttaaagaat gtagctgact gcatacttaa accaccata ctagtgtctg 2400
 ggtgggtttt atgttataat ataaatgtgt ctagagacat tacgttctcc ccttgagtga 2460
 tacacaatga gaaccaactc gtttcaagta gtacctcaca taacttatct tttaaatcaa 2520
 cagaaggaga ttcaccatgg attgtgtgat tgcggcgga ggtattagt gtctttgcat 2580
 cgctcaggcg cttgctacta agcatcctga tgcgtctccg aatttaattg tgaccgaggc 2640
 taaggatcgt gttggaggca acattatcac tcgtgaagag aatgggtttc tctgggaaga 2700
 aggtcccaat agttttcaac cgtctgatcc tatgctcact atgggtgtag atagtgggtt 2760
 gaaggatgat ttggtgttg gagatcctac tgcgccaagg tttgtgtgt ggaatgggaa 2820
 attgaggccg gttccatcga agctaacaga cttaccgttc tttgatttga tgagtattgg 2880
 tgggaagatt agagctggtt ttggtgcact tggcattcga ccgtcacctc caggctcgtga 2940
 agaatctgtg gaggagtgtg tacggcgtaa cctcgggtgat gaggtttttg agcgcctgat 3000
 tgaaccgttt tgttcagggtg tttatgctgg tgatccttca aaactgagca tgaagcagc 3060
 gtttgggaag gtttggaac tagagcaaaa tgggtggaagc ataatagggtg gtacttttaa 3120
 ggcaattcag gagaggaaaa acgctcccaa ggcagaacga gaccgcgcc tgccaaaacc 3180
 acagggccaa acagtgtggt ctttcaggaa gggacttcga atgttgccag aagcaatctc 3240
 tgcaagatta ggtagcaaag ttaagttgtc ttggaagctc ttaggtatca ctaagctgga 3300
 gagcggagga tacaacttaa catatgagac tccagatggt ttagtttccg tgcagagcaa 3360
 aagtgttgta atgacggtgc catctcatgt tgcaagcggc ctcttgcgcc ctctttctga 3420
 atctgctgca aatgcactct caaaactata ttaccacca gttgcagcag tatctatctc 3480
 gtacccgaaa gaagcaatcc gaacagaatg tttgatagat ggtgaactaa aggggttttg 3540
 gcaattgcat ccacgcacgc aaggagtga aacattagga actatctaca gtcctcact 3600
 ctttccaaat cgcgcaccgc ccggaagaat tttgctgttg aacatgattg gcgggtctac 3660
 aaacaccgga attctgtcca agtctgaagg tgagttagtg gaagcagttg acagagattt 3720
 gaggaaaatg ctaattaagc ctaattcgac cgatccactt aaattaggag ttaggggatg 3780

gcctcaagcc attcctcagt ttctagttgg tcactttgat atccttgaca cggctaaatc 3840
 atctctaacg tcttcgggct acgaagggtt atttttgggt ggcaattacg tcgctgggtg 3900
 agccttaggc cgggtgtgtag aaggcgcata tgaaaccgcg attgagggtca acaacttcat 3960
 gtcacggtac gcttacaagt aaatgtaaaa cattaaatct cccagactag ttcaaccgaa 4020
 attcaattaa ggaaataaat taaggaaata caaaaagggg ggtagtcatt tgtatataac 4080
 tttgtatgac ttttctcttc ttttttttg ttttctctcc ctttctttt ctatttgtat 4140
 ttttttatca ttgcttccat tgaactgcag aaagaaggcc cggctccaag ttgttcaaga 4200
 atagtggcgt tgagtcttc gacctttga cttaggatta gtcagttcta tttctcgatg 4260
 gggcggggaa gggatataac tcagcggtag agtgctacct tgacgtgggt gaagtcacat 4320
 gttcgcgcct gattatccct aagcccaatg tgagttttc tagttggatt tgctcccccg 4380
 ccgtcgttca atgagaatgg ataagaggct cgtgggattg acgtgagggg gcagggatgg 4440
 ctatatttct gggagcgaac tccgggcgaa tatgaagcgc atggatacaa gttatgcctt 4500
 ggaatgaaag acaattccga atccgcttg tctacgaaca aggaagctat aagtaatgca 4560
 actatgaatc tcatggagag ttcgatcctg gctcaggatg aacgctggcg gcatgcttaa 4620
 cacatgcaag tcggacggga agtggtgttt ccagtggcgg acgggtgagt aacgcgtaag 4680
 aacctgcctt tgggagggga acaacagctg gaaacggctg ctaatacccc gtaggctgag 4740
 gagcaaaagg aggaatccgc ccgaggaggg gctcgcgtct gattagctag ttggtgaggc 4800
 aatagcttac caaggcgatg atcagtagct ggtccgagag gatgatcagc cacactggga 4860
 ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtggt gaattttccg caatggcgga 4920
 aagcctgacg gagcaatgcc gcgtggaggt agaaggccca cgggtcgtga acttcttttc 4980
 ccggagaaga agcaatgacg gtatctgggg aataagcatc ggctaactct gtgccagcag 5040
 ccgcggtaat acagaggatg caagcgttat ccggaatgat tgggcgcggc ggtggagctc 5100
 cagcttttgt tccctttagt gagggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat ggtcatagct 5160
 gtttctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat 5220
 aaagtgtaaa gcctggggtg cctaattgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc 5280
 actgcccgtt ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg 5340
 cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggag ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct 5400
 gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt 5460
 atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc 5520
 caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggtccgcc cccctgacga 5580
 gcatacaaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata 5640
 ccaggcggtt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac 5700
 cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg 5760
 taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc 5820

cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag	5880
acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt	5940
aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt	6000
atttgggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aanaagagttg gtagctcttg	6060
atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac	6120
gcgagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca	6180
gtggaacgaa aactcacgtt aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac	6240
ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac	6300
ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt	6360
tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt	6420
accatctggc cccagtgcgt caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagattt	6480
atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc	6540
cgcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa	6600
tagtttgccg aacgttggtg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg	6660
tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt	6720
gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc	6780
agtgttatca ctcatgggta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt	6840
aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg	6900
gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac	6960
tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc	7020
gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt	7080
tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaagg	7140
aataaggcgc acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag	7200
catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa	7260
acaaataggg gttccgcgca ctttccccg aaaagtgcc cctgggaaat tgtaaacgtt	7320
aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca gctcattttt taaccaatag	7380
gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt	7440
gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga	7500
aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat caccctaatac aagttttttg	7560
gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag ggagccccg atttagagct	7620
tgacggggaa agccggttca atggaagcaa tgataaaaaa atacaaatag aaaaggaaag	7680
ggaggaaata caaaaaata gaagagaaaa gtcatacaaa gttatataca aatgactacc	7740
cccctttttg tatttcctta atttatttcc ttaattgaat ttcggttgaa ctagtgtgaa	7800
cgaattgtta gacattattt gccgactacc ttggtgatct cgcctttcac gtagtgga	7860

aattcttcca actgatctgc gcgcgagggc aagcgatctt cttcttgctc aagataagcc 7920
tgtctagctt caagtatgac gggtgatac tgggccggca ggcgctccat tgcccagtcg 7980
gcagcgacat ccttcggcgc gattttgccg gttactgcgc tgtaccaa at gcgggacaac 8040
gtaagcacta catttcgctc atcgccagcc cagtcgggcg gcgagttcca tagcgtaag 8100
gtttcattta gcgcctcaaa tagatcctgt tcaggaaccg gatcaaagag ttcttcgcgc 8160
gctggaccta ccaaggcaac gctatgttct cttgcttttg tcagcaagat agccagatca 8220
atgtcgatcg tggctggctc gaagatacct gcaagaatgt cattgcgctg ccattctcca 8280
aattgcagtt cgcgcttagc tggataacgc cacggaatga tgtcgtcgtg cacaacaatg 8340
gtgacttcta cagcgcggag aatctcgctc tctccagggg aagccgaagt ttccaaaagg 8400
tcggtgatca aagctcgccg cgttgtttca tcaagcctta cggtcaccgt aaccagcaaa 8460
tcaatatcac tgtgtggctt caggccgcca tccactgcg agccgtacaa atgtacggcc 8520
agcaacgctg gttcgagatg gcgctcgatg acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat 8580
acttcggcga tcaccgcttc cctcatggta aatgaaagaa agaactaaat actatatttc 8640
actttgaggt ggaaacgtaa caattttttt tattgtcttt ataattattca tattggtttt 8700
tattcgatttt attttatcca tagattataa aaattcataa agaaagacag aatgaataaa 8760
ctcaaattat tacgaatagg tctttcta at gataaataag tatgaattcg gcgaacgtgg 8820
cgagaaagga agggagaaa gcgaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg 8880
tcacgctgcg cgtaaccacc acaccgccc cgcttaatgc gccgctacag ggcgctcgc 8940
gccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt gggaaggcg atcgggtgcg gcctcttcgc 9000
tattacgcca gctggcgaaa gggggatgtg ctgcaaggcg attaagttgg gtaacgccag 9060
ggttttccca gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtga attgtaatac gactcactat 9120
agggcgaaat gggtagaaa tccttcccga tacctcccaa ggaaatctc gaatttggat 9180
cccaaattga cgggttagtg tgagcttatt catgcgggta tgcactcttt gaataggaat 9240
ccgttttctg aaagatcctg gctttcgtac tttggtgggt ctccgagatc ctttcgatga 9300
cctatgttga agggatatct atctaaccg atcgattgcg taaagccgc ggtagcaacg 9360
gaaccgggga agtatacag aaaagacagt tcttttctat tatattagta ttttctatta 9420
tattagatat attagactat tatattagat tagtattagt tagtgatccc gacttagtga 9480
gtctgatgaa ttgttggcac cagtcctaca ttttgtctct gtggaccgag gagaaaagg 9540
gctcggcggg aagaggagtg taccatgaga gaagcaagga ggtcaacctc tttcaaatat 9600
acaacatgga ttctggcaat gtagttggac tctcatgtcg atccgaatga atcatccttt 9660
ccacggaggt aaatctttgc ctgctaggca agaggatagc aagttccaaa tctgtctcg 9720
gtaggacatg tttttctatt actatgaaat tcataaatga agtagttaat ggtagggtta 9780
ccattatcct tttttagtg acgaatcttg tatgtgttcc taagaaaagg aatttgtcca 9840
tttttcgggg tctcaaagg gcgtggaaac gcataaqaac tcttqaatgg aaaagagatg 9900

taactccagt tccttcggaa tcggtagtca atcctatttc cgataggggc agttgacaat 9960
tgaatccgat ttgaccatt attttcatat ccgtaatagt gcgactgcag a 10011

<210> 20

<211> 34

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer da cadeia superior

<220>

<221> características diversas

<222> (1)..(34)

<400> 20

gccagaattc accacgatcg aacgggaatg gata 34

<210> 21

<211> 28

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer da cadeia inferior de 16S NEP-PEP de milho.

<220>

<221> características diversas

<222> (1)..(28)

<400> 21

ctctagagat tcggaattgt ctttcctt 28

<210> 22

<211> 37

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer da cadeia superior de 5'UTR do gene de bacteriófago T3

<220>

<221> características diversas

<222> (1)..(37)

<400> 22

gaagatgccca tggattaaat ctccctaagtt attaaag 37

<210> 23

<211> 37

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer da cadeia superior de 5'UTR de bacteriófago T3.

<220>

<221> características diversas

<222> (1)..(37)

<400> 23

cgaatctctt cccgggtaga gggagacctc atctttg 37

<210> 24

<211> 38

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer da cadeia superior de 16S NEP-PEP (RTK38) de milho.

<220>

<221> características diversas

<222> (1)..(38)

<400> 24
 ctccctctac ccggaagag attcggaatt gtctttcc 38

<210> 25
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Primer da cadeia inferior (RTK37)

<220>
 <221> características diversas
 <222> (1)..(38)

<400> 25
 cgcttagtca tgataaaatc ttggtttatt taatcatc 38

<210> 26
 <211> 85
 <212> ADN
 <213> Bacteriófago X2

<400> 26
aattcgtaa agaattgtagc tgactgcata cttaaaccac ccatactagt tgctgggtgg 60
tttttatggt ataataaaa tgtgt 85

<210> 27
 <211> 85
 <212> ADN
 <213> Bacteriófago x2

<400> 27
ctagacacat ttatattata acataaaaac caccagcaa ctagtatggg tggtttaagt 60
atgcagtcag ctacattctt taacg 85

<210> 28
 <211> 28

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer da cadeia superior de 5'UTR do gene 10 de
kvpI

<220>

<221> características diversas

<222> (1)..(28)

<400> 28

gttctagaga cattacgttc tccccttg 28

<210> 29

<211> 29

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Primer da cadeia inferior de 5'UTR do gene 10 de
kvpI

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(29)

<400> 29

agatatccat ggtgaatctc ctgttgatt 29

Lisboa, 19 de Abril de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para a obtenção de uma planta transplastômica, compreendendo os passos de:

- a) Introdução, nos plastídeos da célula vegetal, de um vetor de transformação compreendendo duas moléculas artificiais de ADN de marcadores de seleção distintos, em que a primeira molécula artificial de ADN compreende um promotor funcional num plastídeo de uma célula vegetal e uma região de terminação de transcrição funcional num plastídeo de uma célula vegetal, operativamente ligada a um primeiro marcador de seleção que confere resistência a um composto de seleção não letal; a segunda molécula artificial de ADN compreende um promotor funcional num plastídeo de uma célula vegetal e uma região de terminação de transcrição funcional num plastídeo de uma célula vegetal, operativamente ligada a um segundo marcador de seleção, que confere tolerância a um composto letal, em que a primeira molécula artificial de ADN com o primeiro marcador de seleção está presente na sequência do esqueleto do vetor, e a segunda molécula artificial de ADN com o segundo marcador de seleção está flanqueada por sequências de ácidos nucleicos que são homólogos a sequências de ácidos nucleicos não essenciais alvo do plastídeo;
- b) Colocação da célula vegetal num primeiro meio de cultura compreendendo um composto não letal para plastídeos, ao qual o primeiro marcador de seleção confere resistência, durante 1) um período de cerca

de 2 semanas ou 2) ou até que apareçam rebentos num calo formado a partir da célula vegetal; e

c) Colocação da célula vegetal num segundo meio de cultura compreendendo um composto letal para plastídeos, ao qual o segundo marcador de seleção confere resistência, durante um período de tempo suficiente para permitir que a célula vegetal se torne homoplásmica para o marcador letal; e

d) Obtenção de uma planta transplastômica compreendendo apenas o segundo marcador letal.

2. O método da reivindicação 1, em que o vetor de transformação de plastídeos compreende ainda uma ou mais moléculas artificiais de ADN de produtos de genes de interesse, que possam ser expressos em plastídeos, adjacentes ao marcador letal.

3. O método da reivindicação 1, em que o marcador letal e a molécula ou moléculas artificiais de ADN estão organizados na forma de um gene policistrónico tipo operão.

4. O método da reivindicação 1, em que o marcador não letal é um gene de resistência a antibióticos.

5. O método da reivindicação 4, em que o gene de resistência a antibiótico é *aadA* e o composto de seleção não letal é espectinomicina ou estreptomicina.

6. O método da reivindicação 1, em que o marcador letal é um gene de tolerância a herbicidas.

7. O método da reivindicação 6, em que o gene de tolerância a herbicida é uma forma mutada de uma protoporfirinogênio oxidase, e o composto de seleção letal é butafenacil ou Fórmula XVII.
8. O método da reivindicação 1, em que o vetor de transformação de plastídeos referido compreende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 19.
9. Um vetor de transformação de plastídeos compreendendo um marcador não letal que está presente na sequência do esqueleto do vetor, e um marcador letal flanqueado por sequências, as quais são homólogas a sequências não essenciais de ADN de plastídeo.
10. O vetor de transformação de plastídeos da reivindicação 9, compreendendo a sequência SEQ ID NO: 1, em que o marcador não letal está presente no esqueleto do vetor.
11. Um vetor de transformação de plastídeos, compreendendo um marcador não letal que está presente na sequência do esqueleto do vetor, e um marcador letal adjacente a uma ou mais moléculas artificiais de ADN de produtos de genes de interesse, que possam ser expressos em plastídeos, flanqueadas por sequências que são homólogas a sequências não essenciais de ADN de plastídeo, em que o marcador letal e a ou as moléculas artificiais de ADN com o gene, têm diferentes promotores funcionais em plastídeos e são expressas de forma independente, ou em que o marcador letal e a ou as moléculas artificiais de ADN com o gene estão organizados na forma de um gene policistrónico tipo operação.

12. O vetor de transformação de plastídeos da reivindicação 11, compreendendo SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 19.

Lisboa, 19 de Abril de 2012

Figura 1

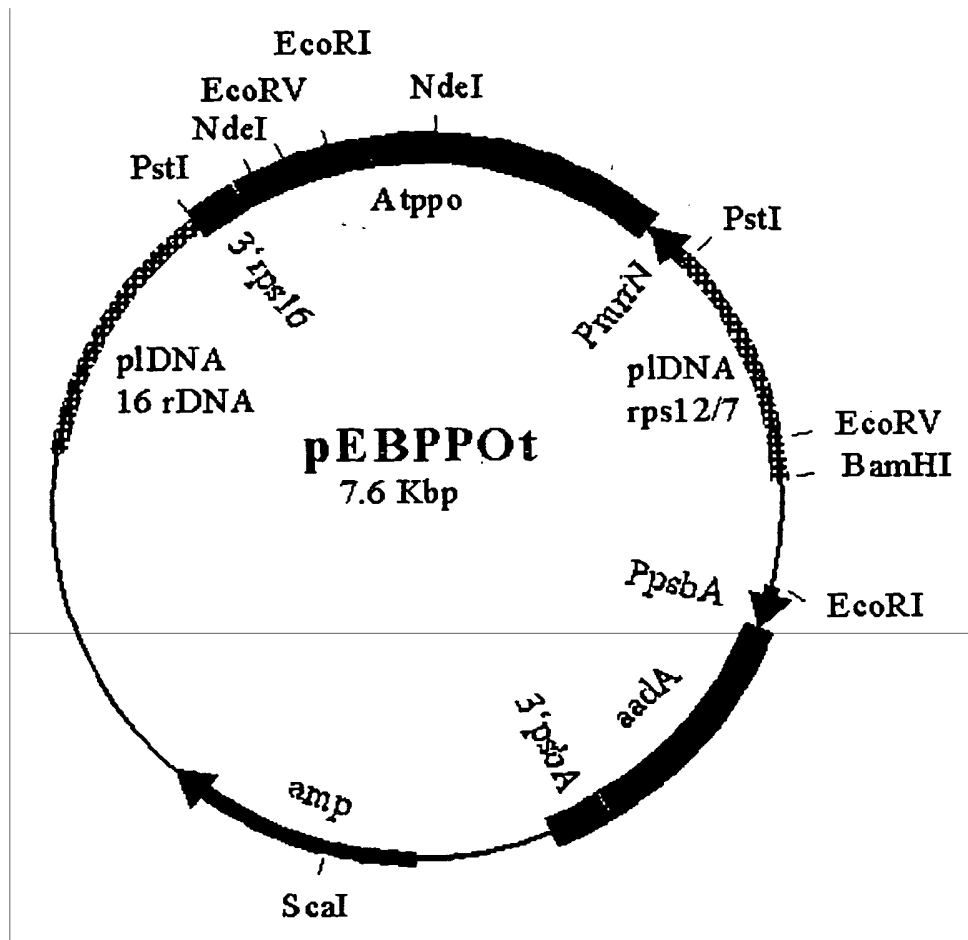


Figura 2

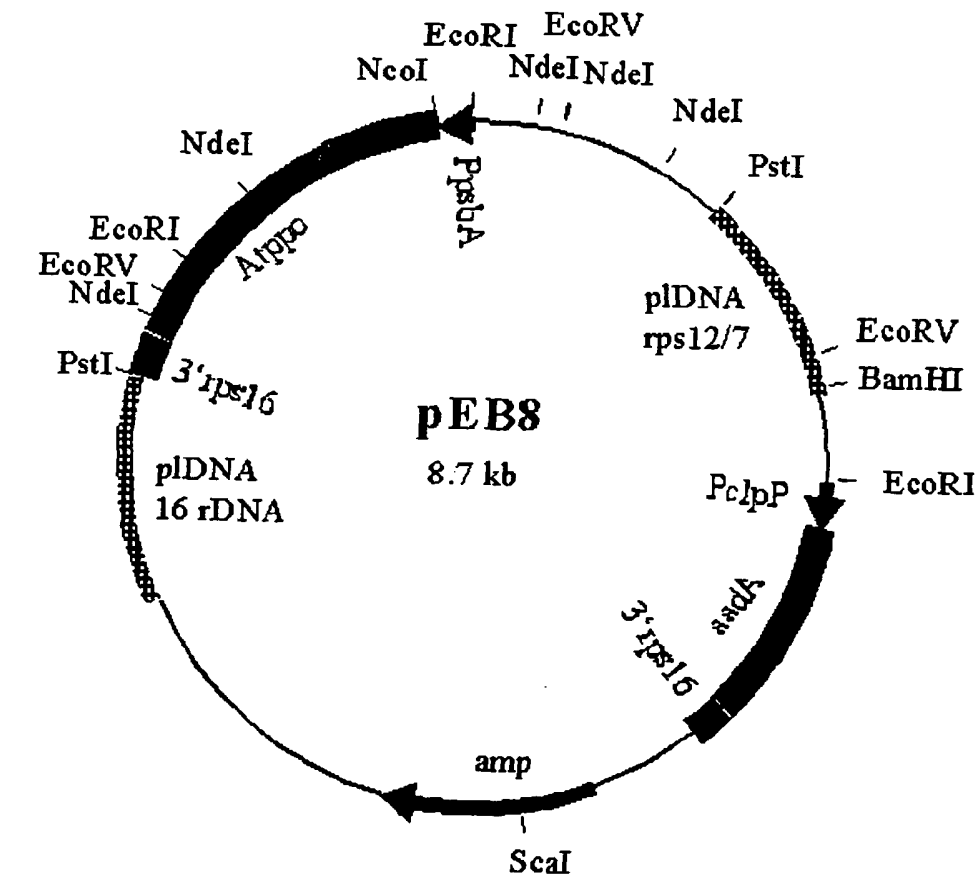


Figura 3

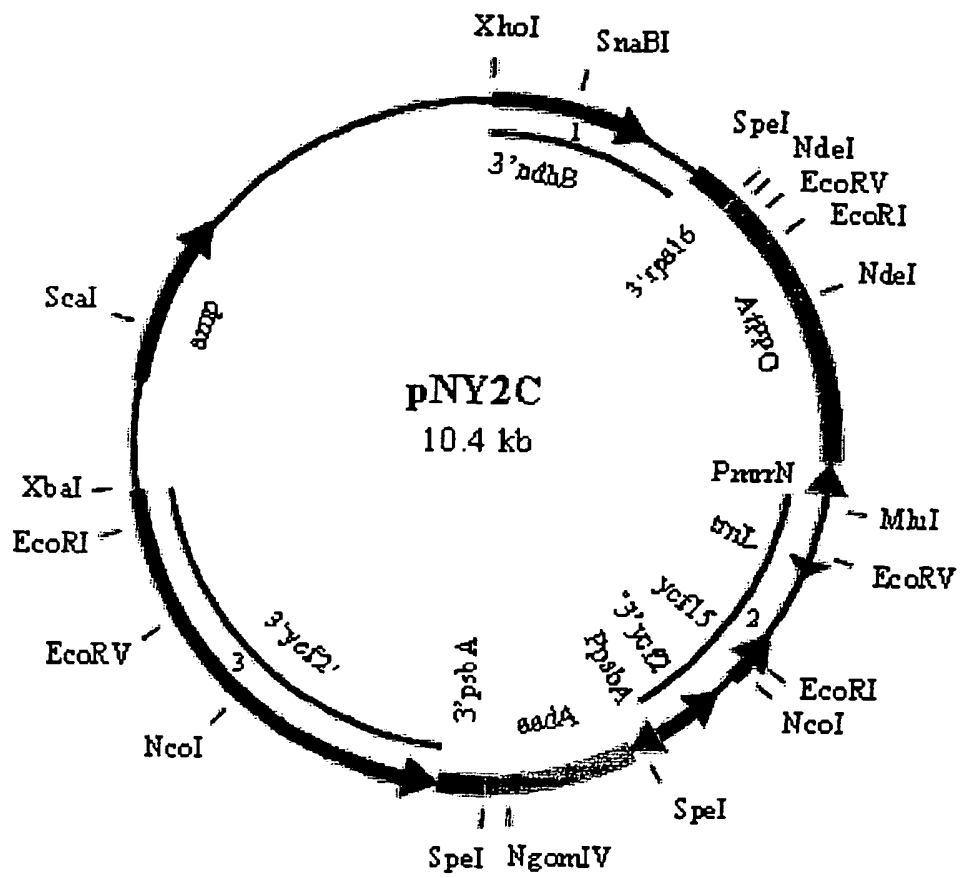


Figura 4

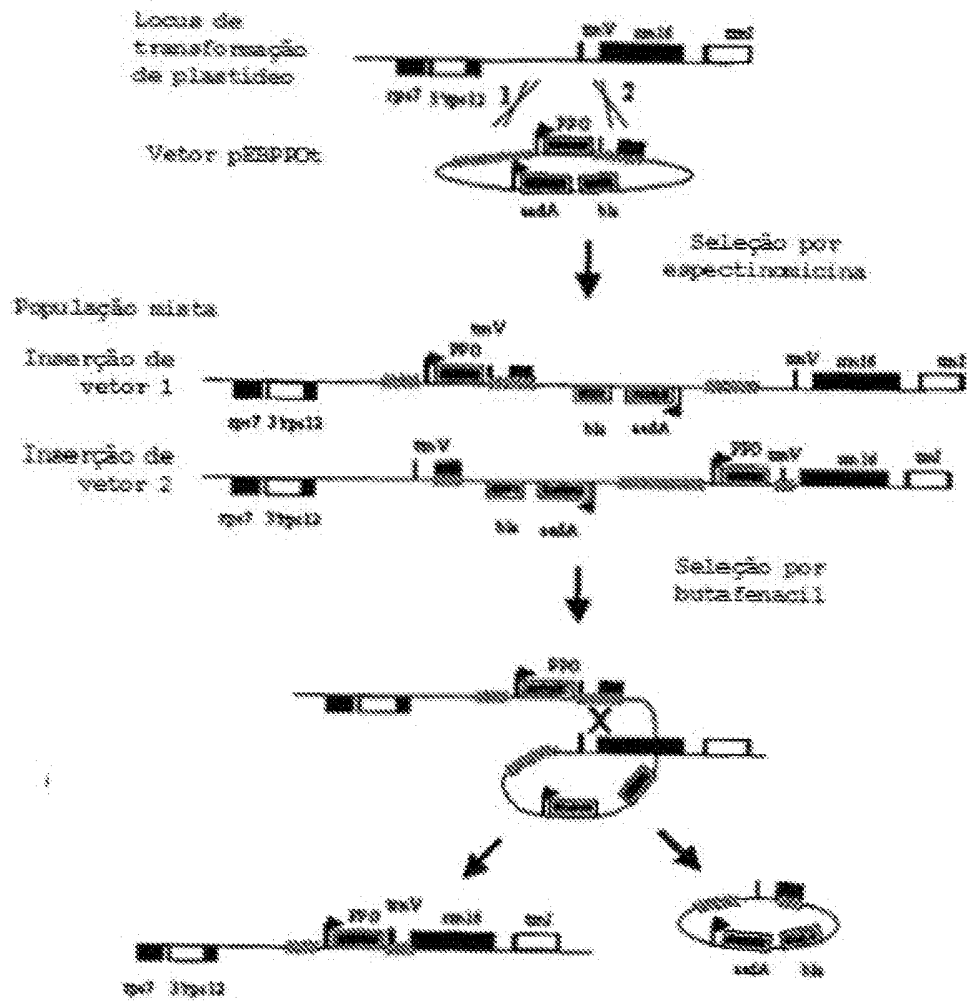


Figura 5

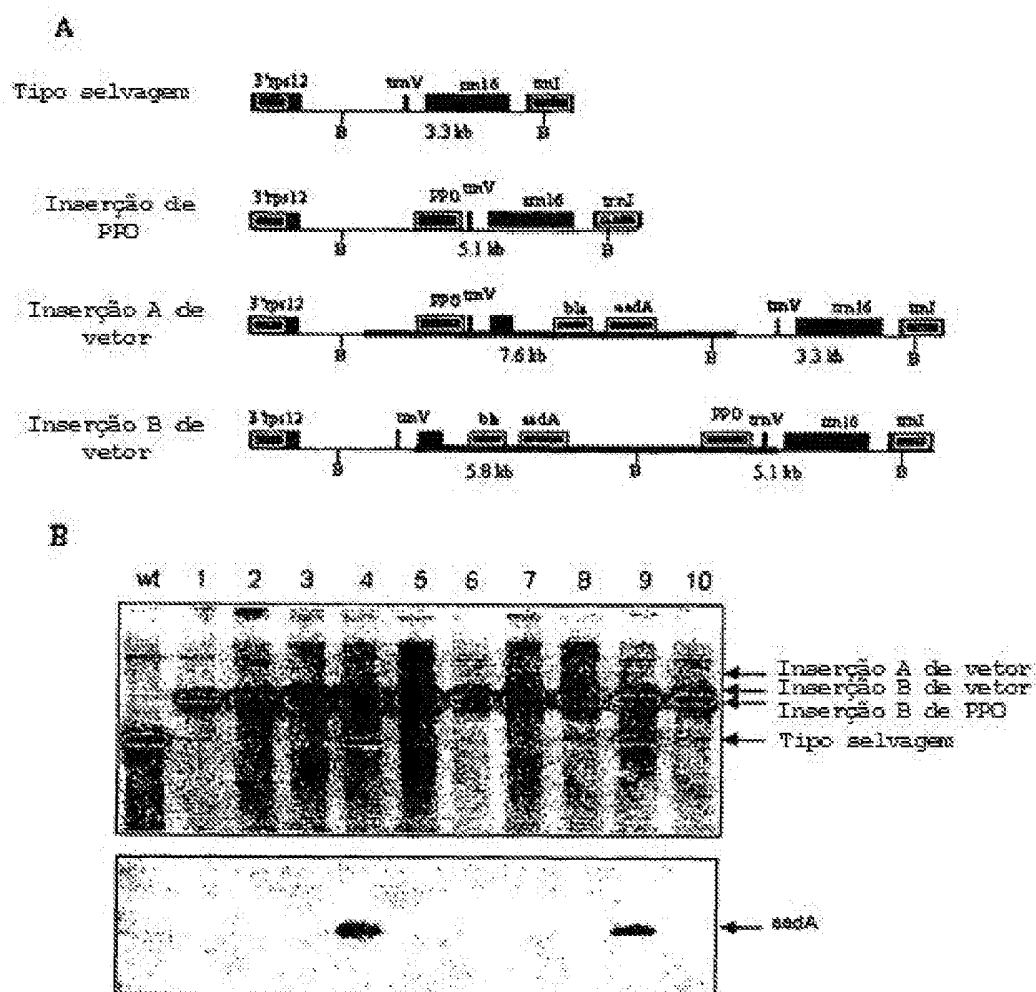


Figura 6

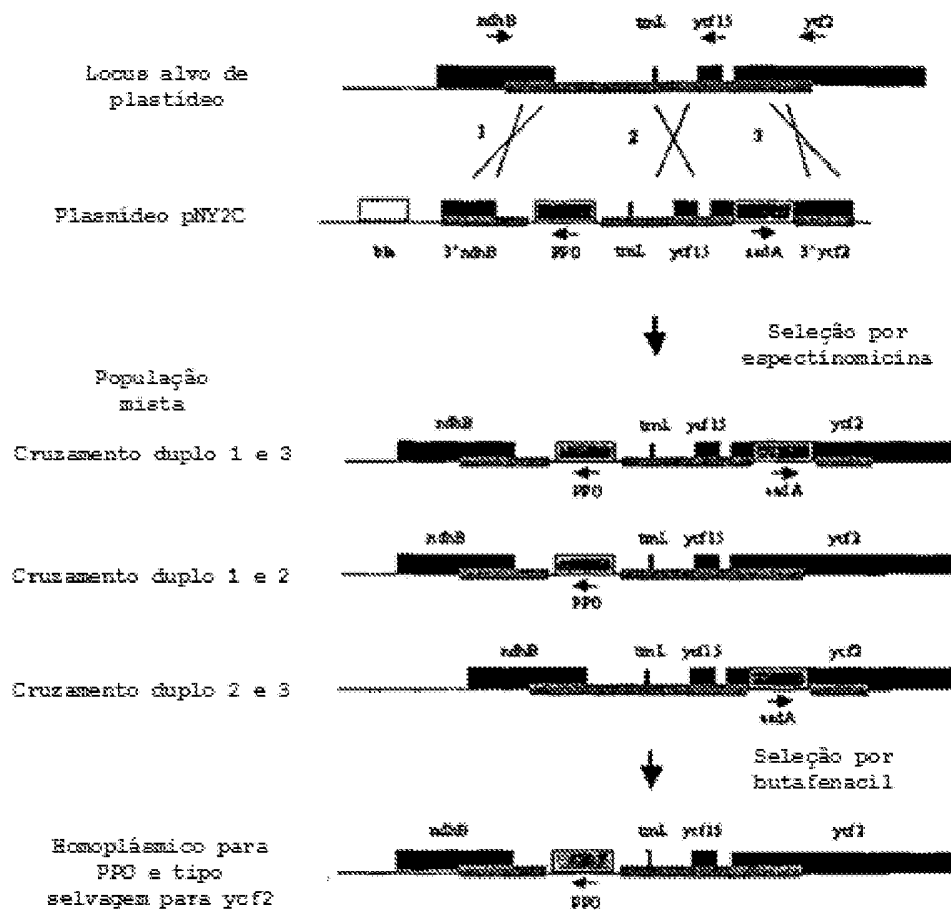


Figura 7

