



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102016019231-5 A2



(22) Data do Depósito: 19/08/2016

(43) Data da Publicação Nacional: 13/10/2020

(54) **Título:** MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO QUIMÉRICA, POLIPEPTÍDEO, VETOR DE EXPRESSÃO EM PLANTA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM MATERIAL DE PLANTA TRANSGÊNICA E USO DE PLANTA TRANSGÊNICA OU PARTES DA MESMA

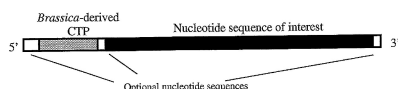
(51) **Int. Cl.:** C12N 15/29; C12N 15/82; C07K 14/415; C07H 21/04; A01H 1/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 20/08/2015 US 62/207,685.

(71) **Depositante(es):** DOW AGROSCIENCES LLC.

(72) **Inventor(es):** JUSTIN M. LIRA; ROBERT CICCHILLO; CARLA N. YERKES; ANDREW E. ROBINSON.

(57) **Resumo:** MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO QUIMÉRICA, POLIPEPTÍDEO, VETOR DE EXPRESSÃO EM PLANTA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM MATERIAL DE PLANTA TRANSGÊNICA E USO DE PLANTA TRANSGÊNICA OU PARTES DA MESMA A presente invenção refere-se a composições e métodos para o direcionamento de peptídeos, polipeptídeos, e proteínas para plastídeos de células contendo plastídeo. Em algumas modalidades, a presente invenção refere-se a peptídeos de trânsito de cloroplastos que podem direcionar um polipeptídeo para um plastídeo, e moléculas de ácido nucleico codificando os mesmos. Em algumas modalidades, a presente invenção refere-se a métodos para a produção de um material de planta transgênica (por exemplo, uma planta transgênica) compreendendo um peptídeo de trânsito de cloroplastos, bem como materiais de planta produzidos pelos métodos referidos, e produtos de base de plantas produzidos a partir dos mesmos.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO QUIMÉRICA, POLIPEPTÍDEO, VETOR DE EXPRESSÃO EM PLANTA, MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM MATERIAL DE PLANTA TRANSGÊNICA E USO DE PLANTA TRANSGÊNICA OU PARTES DA MESMA".**

DECLARAÇÃO DE ACORDO COM A 37 C.F.R. § 1.821(c) ou (e)-
LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS SUBMETIDA COMO ARQUIVO DE
TEXTO ASCII

[001] Em conformidade com a 37 C.F.R. § 1.821(c) ou (e), um arquivo contendo uma versão de texto ASCII da Listagem de Sequências foi submetido concomitante com o presente requerimento de patente, cujo conteúdo é por este incorporado por meio de referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a composições e métodos para codificação e expressão geneticamente de polipeptídeos que são direcionados para cloroplastos de plantas superiores. Em determinadas modalidades, a presente invenção se refere a sequências de aminoácidos que direcionam polipeptídeos quiméricos para cloroplastos, e/ou moléculas de ácido nucleico codificando os mesmos. Em determinadas modalidades, a presente invenção se refere a polipeptídeos quiméricos compreendendo uma sequência de aminoácidos que controlam o trânsito dos polipeptídeos quiméricos para cloroplastos, e/ou moléculas de ácido nucleico codificando os mesmos.

ANTECEDENTES

[003] As células de plantas contêm organelas subcelulares distintas, referidas de modo geral como "plastídeos," que são delimitadas por sistemas de membrana característicos e realizam funções especializadas dentro da célula. Plastídeos particulares são responsáveis pela fotossíntese, bem como pela síntese e pelo armazenamento de determinados compostos químicos. Todos os plastídeos são derivados de

proplastídeos que estão presentes nas regiões meristemáticas da planta. Os proplastídeos podem se desenvolver em, por exemplo: cloroplastos, etioplastos, cromoplastos, gerontoplastos, leucoplastos, amiloplastos, elaioplastos, e proteinoplastos. Os plastídeos existem em um modo semi-autônomo dentro da célula, contendo seus próprios sistemas genéticos e mecanismos de síntese de proteínas, porém se baseando em uma íntima cooperação com o sistema nucleocitoplasmático em seu desenvolvimento e suas atividades biossintéticas.

[004] Em células de folhas fotossintéticas de plantas superiores, os plastídeos mais conspícuos são os cloroplastos. A função mais essencial dos cloroplastos é o desempenho das reações de fotossíntese acionadas pela luz. Porém, os cloroplastos também realizam muitos outros processos biossintéticos de importância para a célula da planta. Por exemplo, todos os ácidos graxos das células são produzidos por enzimas localizadas no estroma dos cloroplastos, usando ATP, NADPH, e os carboidratos prontamente disponíveis aí. Além disso, a potência de redução dos elétrons ativados pela luz aciona a redução de nitrito (NO_2^-) para amônia (NH_3) no cloroplasto; esta amônia proporciona à planta o nitrogênio necessário para a síntese de aminoácidos e nucleotídeos.

[005] O cloroplasto também participa de processos de particular importância na indústria agroquímica. Por exemplo, é de conhecimento geral que muitos herbicidas agem bloqueando funções as quais são realizadas dentro do cloroplasto. Recentes estudos identificaram o alvo específico de vários herbicidas. Por exemplo, os herbicidas derivados de triazina inibem a fotossíntese deslocando uma molécula de plastoquinona de seu sítio de ligação no polipeptídeo 32 kD do fotossistema II. Este polipeptídeo 32 kD é codificado no genoma de cloroplasto e sintetizado pelo mecanismo das organelas. Foram obtidas

plantas mutantes as quais são resistentes aos herbicidas de triazina. Estas plantas contêm um polipeptídeo 32 kD mutante do qual a plastoquinona não pode mais ser deslocada pelos herbicidas de triazina. As sulfonilureias inibem a acetolactato sintase no cloroplasto. A acetolactato sintase está envolvida na síntese de isoleucina e de valina. O glifosato inibe a função da 5-enol piruvil-3-fosfoshikimato sintase (EPSPS), a qual é uma enzima envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos. Todas estas enzimas são codificadas pelo genoma nuclear, porém são translocadas no cloroplasto onde ocorre a síntese de aminoácidos real.

[006] A maioria das proteínas do cloroplasto são codificadas no núcleo da célula de planta, sintetizadas como proteínas precursoras maiores no citosol, e importadas pós-translacionalmente para dentro do cloroplasto. A importação através das membranas de envelope externo e interno para dentro do estroma é o principal meio para o ingresso de proteínas destinadas para o estroma, a membrana tilacoide, e o lúmen tilacoide. A localização de proteínas precursoras importadas para a membrana tilacoide e o lúmen tilacoide é realizada por quatro mecanismos distintos, incluindo dois que são homólogos a sistemas de transporte de proteínas bacterianas. Portanto, os mecanismos para localização de proteínas no cloroplasto são em parte derivados do endossimbionte procariótico. Cline and Henry (1996), *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12:1-26.

[007] As proteínas precursoras destinadas para expressão cloroplástica contêm extensões de N-terminal conhecidas como peptídeos de trânsito de cloroplastos (CTPs). O peptídeo de trânsito é instrumental para o reconhecimento específico da superfície do cloroplasto e na mediação da translocação pós-translacional de pré-proteínas através do envelope cloroplástico e por consequência para os vários subcompartimentos dentro do cloroplasto (por exemplo, estroma, tilacoide,

e membrana tilacoide). Estas sequências de peptídeo de trânsito de N-terminal contêm toda a informação necessária para a importação da proteína do cloroplasto para dentro dos plastídeos; as sequências de peptídeo de trânsito são necessárias e suficientes para importação para os plastídeos.

[008] Os genes de plantas reportados por terem sequências de peptídeo de trânsito codificadas naturalmente em seu N-término incluem a subunidade pequena do cloroplasto de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (RuBisCo) (de Castro Silva-Filho *et al.* (1996), *Plant Mol. Biol.* 30:769-80; Schnell *et al.* (1991), *J. Biol. Chem.* 266:3335-42); EPSPS (vide, por exemplo, Archer *et al.* (1990), *J. Bioenerg. and Biomemb.* 22:789-810 e as Patentes dos Estados Unidos Nos. 6.867.293, 7.045.684, e Re. 36.449); triptofano sintase (Zhao *et al.* (1995), *J. Biol. Chem.* 270:6081-7); plastocianina (Lawrence *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.* 272:20357-63); corismato sintase (Schmidt *et al.* (1993), *J. Biol. Chem.* 268:27447-57); a proteína de ligação da clorofila a/b de captura de luz (LHBP) (Lamppa *et al.* (1988), *J. Biol. Chem.* 263:14996-14999); e a proteína do cloroplasto de *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.* (2008), *Plant Cell* 20:1603-22). Publicação de Patente dos Estados Unidos No. US 2010/0071090 proporciona alguns peptídeos tendo por alvo cloroplasto de *Chlamydomonas* sp.

[009] No entanto, os requisitos estruturais para a informação codificada pelos peptídeos tendo por alvo cloroplastos permanecem elusivos, devido a seu alto nível de diversidade de sequência e carecem de motivos de sequência de consenso ou comum, embora seja possível que haja subgrupos distintos de peptídeos tendo por alvo cloroplasto com motivos estruturais independentes. Lee *et al.* (2008), *supra*. Além disso, nem todas estas sequências têm sido úteis na expressão heteróloga de proteínas direcionadas para cloroplastos em plantas superiores.

BREVE SUMÁRIO DA PRESENTE INVENÇÃO

[0010] São descritos aqui, composições e métodos para direcionamento por cloroplastos de polipeptídeos em uma planta. Em algumas modalidades, as composições compreendem uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos (por exemplo, um peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28) ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse. Em modalidades particulares, as moléculas de ácido nucleico referidas podem ser úteis para expressão e direcionamento de um polipeptídeo codificado pela sequência de nucleotídeos de interesse em uma planta monocotiledônea ou dicotiledônea. São adicionalmente descritos vetores compreendendo uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 ligada operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse.

[0011] Em algumas modalidades, uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser uma sequência de nucleotídeos procariótica, ou uma variante funcional da mesma. Em algumas modalidades, uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser uma sequência de nucleotídeos isolada a partir de um eucariota fotossintético inferior (por exemplo, uma sequência isolada a partir de uma Clorófito, tal como *Chlamydomonas* e *Dunaliella*), ou uma variante funcional da mesma. Em algumas modalidades, uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser uma

sequência de nucleotídeos isolada a partir de um eucariota fotosintético superior (por exemplo, uma sequência isolada a partir de uma planta dicotiledônea, tal como *Brassica napus*, *Amaranthus*, *Calystegia*, e *Glycine max*, ou uma planta monocotiledônea, tal como *Oryza sativa*), ou uma variante funcional da mesma. Em modalidades específicas, uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser uma sequência de nucleotídeos isolada a partir de *Brassica napus*, *Glycine max*, *Oryza sativa*, *Amaranthus*, *Calystegia*, e *Dunaliella salina* e *Chlamydomonas reinhardtii*. Em modalidades adicionais, uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser uma sequência de nucleotídeos quimérica compreendendo um sequência de nucleotídeos de peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 procariótica parcial, ou uma variante funcional da mesma. Em ainda modalidades adicionais, uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser uma sequência de nucleotídeos quimérica compreendendo mais de uma sequências de nucleotídeos de peptídeo de trânsito de cloroplastos eucarióticas, tal como mais de uma (por exemplo, duas) sequências de nucleotídeos de peptídeo de trânsito de cloroplastos de diferentes espécies de plantas, ou variantes funcionais das mesmas. Em ainda modalidades adicionais, uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser uma sequência de nucleotídeos sintética, a qual pode ser projetada no mínimo em parte por meio de referência a uma sequência de nucleotídeos de peptídeo de trânsito de cloroplastos

TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 procariótica. Em ainda modalidades adicionais, uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser uma sequência de nucleotídeos sintética, a qual pode ser projetada no mínimo em parte por meio de referência a uma sequência de nucleotídeos de peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 eucariótica. Em ainda modalidades adicionais, uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser uma sequência de nucleotídeos sintética, a qual pode ser projetada no mínimo em parte por meio de referência a uma sequência de nucleotídeos de peptídeo de trânsito de cloroplastos eucariótica fr uma sequência genética de EPSPS ou qualquer outra sequência genética contendo um peptídeo de trânsito de cloroplastos.

[0012] Em algumas modalidades, as composições compreendem uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo um meio para o direcionamento de um polipeptídeo para um cloroplasto ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse. Em modalidades particulares, as moléculas de ácido nucleico referidas podem ser úteis para expressão e direcionamento de um polipeptídeo codificado pela sequência de nucleotídeos de interesse em uma planta monocotiledônea ou dicotiledônea. São adicionalmente descritos vetores compreendendo uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo um meio para o direcionamento de um polipeptídeo para um cloroplasto ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse. Outras modalidades descrevem um meio para o direcionamento de um polipeptídeo para um cloroplasto através de uma sequência de nucleotídeos de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18,

TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 e equivalentes funcionais das mesmas.

[0013] Além disso são descritos aqui, plantas, tecidos de plantas, e células de plantas compreendendo uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 ligada operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse. Em algumas modalidades, uma planta, um tecido de planta, ou uma célula de planta pode ter uma molécula de ácido nucleico semelhante integrada de modo estável em seu genoma. Em algumas modalidades, uma planta, um tecido de planta, ou uma célula de planta pode expressar transitariamente uma molécula de ácido nucleico semelhante.

[0014] Também são descritos métodos para a expressão de uma sequência de nucleotídeos nos cloroplastos da planta ou das células de plantas. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 ligada operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse pode ser usada para transformar uma célula de planta, de modo a que um polipeptídeo de fusão precursor compreendendo o peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 fundido a um produto de expressão da sequência de nucleotídeos de interesse seja produzido no citoplasma da célula de planta, e em seguida o polipeptídeo de fusão é transportado *in vivo* para dentro de um cloroplasto da célula de planta.

[0015] São adicionalmente descritos métodos para a produção de uma planta transgênica que compreende uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos co-

dificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 ligada operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse. Além disso são descritos produtos de plantas (por exemplo, sementes) produzidos a partir das plantas transgênicas referidas.

[0016] As características precedentes e outras características se tornarão evidentes a partir da descrição detalhada de várias modalidades que se segue, a qual prossegue com referência às figuras anexadas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0017] A FIG. 1 proporciona uma molécula de mRNA que é representativa de exemplos particulares de sequências de nucleotídeos codificando CTP sintéticos (por exemplo, o peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28) ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse. Em algumas modalidades, uma molécula de mRNA (tal como a molécula de mRNA mostrada) pode ser transcrita a partir de uma molécula de DNA compreendendo um frame de leitura aberta incluindo a sequência codificando CTP sintético ligada operacionalmente à sequência de nucleotídeos de interesse. A sequência de nucleotídeos de interesse pode ser, em algumas modalidades, uma sequência codificando um peptídeo de interesse, por exemplo e sem limitação, um produto genético marcador ou um peptídeo a ser direcionado para um plastídeo.

[0018] A FIG. 2 proporciona um alinhamento dos peptídeos de trânsito de cloroplastos previstos de *Brassica napus*, *Dunaliella salina*, *Oryza sativa*, *Amaranthus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Calystegia* e *Glycine max*. O asterisco indica onde as sequências foram divididas e recombinadas para formar as várias sequências TraP quiméricas. Deve ser observado que foi usado *Amaranthus* em dois peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos diferentes (TraP18 e TraP19), e foi

unido em duas localizações diferentes dentro da sequência conforme mostrado pela presença de dois asteriscos diferentes.

[0019] A FIG. 3 proporciona um mapa de plasmídeo de pDAB101979.

[0020] A FIG. 4 proporciona um mapa de plasmídeo de pDAB101980.

[0021] A FIG. 5 proporciona um mapa de plasmídeo de pDAB107634.

[0022] A FIG. 6 proporciona um mapa de plasmídeo de pDAB107635.

[0023] A FIG. 7 proporciona um mapa de plasmídeo de pDAB107636.

[0024] A FIG. 8 proporciona um mapa de plasmídeo de pDAB109847.

[0025] A FIG. 9 proporciona um mapa de plasmídeo de pDAB109848.

[0026] A FIG. 10 proporciona um mapa de plasmídeo de pDAB109849.

[0027] A FIG. 11 proporciona um mapa de plasmídeo de pDAB101908.

[0028] A FIG. 12 proporciona uma imagem de microscopia de TraP10-YFP infiltrados em tecidos de folhas de tabaco e translocados para dentro dos cloroplastos dos tecidos de folhas de tabaco.

[0029] A FIG. 13 proporciona uma imagem de microscopia de TraP11-YFP infiltrados em tecidos de folhas de tabaco e translocados para dentro dos cloroplastos dos tecidos de folhas de tabaco.

[0030] A FIG. 14 proporciona uma imagem de microscopia de TraP17-GFP infiltrados em tecidos de folhas de tabaco que não foram translocados para dentro dos cloroplastos dos tecidos de folhas de tabaco.

[0031] A FIG. 15 proporciona uma imagem de microscopia de TraP18-GFP infiltrados em tecidos de folhas de tabaco que foram translocados para dentro dos cloroplastos dos tecidos de folhas de tabaco.

[0032] A FIG. 16 proporciona uma imagem de microscopia de TraP19-GFP infiltrados em tecidos de folhas de tabaco e translocados para dentro dos cloroplastos dos tecidos de folhas de tabaco.

[0033] A FIG. 17 proporciona uma imagem de microscopia de TraP26-GFP infiltrados em tecido de folhas de tabaco e translocados para dentro dos cloroplastos dos tecidos de folhas de tabaco.

[0034] A FIG. 18 proporciona uma imagem de microscopia de TraP27-GFP infiltrados em tecidos de folhas de tabaco e translocados para dentro dos cloroplastos dos tecidos de folhas de tabaco.

[0035] A FIG. 19 proporciona uma imagem de microscopia de TraP28-GFP infiltrados em tecidos de folhas de tabaco e translocados para dentro dos cloroplastos dos tecidos de folhas de tabaco.

[0036] A FIG. 20 proporciona uma imagem de microscopia de controles de YFP não direcionados que foram infiltrados em tecidos de folhas de tabaco e não foram incorporados dentro dos cloroplastos dos tecidos de folhas de tabaco.

[0037] A FIG. 21 proporciona uma imagem de microscopia de TraP17-GFP transformados em protoplastos de milho e translocados para dentro dos cloroplastos dos protoplastos de milho.

[0038] A FIG. 22 proporciona uma imagem de microscopia de TraP18-GFP transformados em protoplastos de milho e translocados para dentro dos cloroplastos dos protoplastos de milho.

[0039] A FIG. 23 proporciona uma imagem de microscopia de TraP19-GFP transformados em protoplastos de milho e translocados para dentro dos cloroplastos dos protoplastos de milho.

[0040] A FIG. 24 proporciona um mapa de plasmídeo de

pDAB107538.

[0041] A FIG. 25 proporciona um mapa de plasmídeo de pDAB107617.

[0042] A FIG. 26 proporciona um mapa de plasmídeo de pDAB114286.

[0043] A FIG. 27 proporciona um mapa de plasmídeo de pDAB114287.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0044] As sequências de ácido nucleico listadas na Listagem de Sequências anexada são mostradas usando abreviações de letras de rotina para bases de nucleotídeos, conforme definido na 37 C.F.R. § 1.822. Somente um filamento de cada sequência de ácido nucleico é proporcionado na Listagem de Sequências anexada, porém o filamento complementar é entendido como sendo incluído por qualquer referência ao filamento apresentado. Na Listagem de Sequências anexada:

[0045] A SEQ ID NO: 1 mostra a sequência de aminoácidos de TraP10.

[0046] A SEQ ID NO: 2 mostra a sequência de aminoácidos de TraP11.

[0047] A SEQ ID NO: 3 mostra a sequência de aminoácidos de TraP17.

[0048] A SEQ ID NO: 4 mostra a sequência de aminoácidos de TraP18.

[0049] A SEQ ID NO: 5 mostra a sequência de aminoácidos de TraP19.

[0050] A SEQ ID NO: 6 mostra a sequência de aminoácidos de TraP26.

[0051] A SEQ ID NO: 7 mostra a sequência de aminoácidos de TraP27.

[0052] A SEQ ID NO: 8 mostra a sequência de aminoácidos de TraP28.

[0053] A SEQ ID NO: 9 mostra a sequência de polinucleotídeos de TraP10.

[0054] A SEQ ID NO: 10 mostra a sequência de polinucleotídeos de TraP11.

[0055] A SEQ ID NO: 11 mostra a sequência de polinucleotídeos de TraP17.

[0056] A SEQ ID NO: 12 mostra a sequência de polinucleotídeos de TraP18.

[0057] A SEQ ID NO: 13 mostra a sequência de polinucleotídeos de TraP19.

[0058] A SEQ ID NO: 14 mostra a sequência de polinucleotídeos de TraP26.

[0059] A SEQ ID NO: 15 mostra a sequência de polinucleotídeos de TraP27.

[0060] A SEQ ID NO: 16 mostra a sequência de polinucleotídeos de TraP28.

DESCRIÇÃO DETALHADA

I. Visão geral de várias modalidades

[0061] Um peptídeo de trânsito de cloroplastos (CTP) (ou peptídeo de trânsito de plastídeos) funciona co-translacionalmente ou pós-translacionalmente para direcionar um polipeptídeo compreendendo o CTP para um plastídeo, por exemplo, um cloroplasto. Em algumas modalidades da invenção, ou proteínas de endogenous cloroplastos endógenas ou proteínas heterólogas podem ser direcionadas para um cloroplasto por expressão de uma tal proteína como um polipeptídeo precursor maior compreendendo um CTP.

[0062] Em uma modalidade de exemplo, uma sequência de ácido nucleico codificando um CTP foi isolada a partir de uma sequência ge-

nética de EPSPS obtida a partir de *Brassica napus* (Banco de Dados NCBI Acesso No. P17688), uma sequência genética de EPSPS obtida a partir de *Glycine max* (Banco de Dados NCBI Acesso No. XP_003517039), uma sequência genética de EPSPS obtida a partir de *Calystegia* (Banco de Dados NCBI Acesso No. ACB37380), uma sequência genética de EPSPS obtida a partir de *Chlamydomonas reinhardtii* (Banco de Dados NCBI Acesso No. XP_001702942), uma sequência genética de EPSPS obtida a partir de *Oryza sativa* (Banco de Dados NCBI Acesso No. AF413082_1), uma sequência genética de EPSPS obtida a partir de *Amaranthus* (Banco de Dados NCBI Acesso No. ACV53022), e uma sequência genética de EPSPS obtida a partir de *Dunaliella salina* (Banco de Dados NCBI Acesso No.: AMBM68632). O CTP foi identificado e isolado a partir da proteína de comprimento total analisando a sequência genética com o servidor de previsão ChloroP. Emanuelsson *et al.* (1999), *Protein Science* 8:978-84 (disponível em cbs.dtu.dk/services/ChloroP). Os produtos de proteína, previstos das sequências codificando CTP isoladas, foram usados para produzir as sequências de ácido nucleico codificando CTP quiméricas da invenção em questão, TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28.

[0063] Em uma modalidade de exemplo adicional, um peptídeo TraP10 foi sintetizado de modo independente e fundido a uma proteína fluorescente amarela (YFP) para produzir um polipeptídeo TraP10-YFP quimérico. Uma molécula de ácido nucleico codificando o polipeptídeo TraP10-YFP quimérico foi introduzida em um vetor binário, de tal modo que a sequência de ácido nucleico codificando TraP10-YFP foi ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10.

[0064] Em ainda uma modalidade de exemplo adicional, um vetor binário compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando TraP10-YFP ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10 foi tran-

ditoriamente transformado em tabaco (*Nicotiana tabacum*) através de *Agrobacterium*. Microscopia confocal e análise por Western blot confirmou que TraP10 direcionou com sucesso YFP para cloroplastos de tabaco.

[0065] Em uma modalidade de exemplo adicional, um peptídeo TraP11 foi sintetizado de modo independente e fundido a uma proteína fluorescente amarela (YFP) para produzir um polipeptídeo TraP11-YFP quimérico. Uma molécula de ácido nucleico codificando o polipeptídeo TraP11-YFP quimérico foi introduzida em um vetor binário, de tal modo que a sequência de ácido nucleico codificando TraP11-YFP foi ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10.

[0066] Em ainda uma modalidade de exemplo adicional, um vetor binário compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando TraP11-YFP ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10 foi transitoriamente transformado em tabaco (*Nicotiana tabacum*) através de *Agrobacterium*. Microscopia confocal e análise por Western blot confirmou que TraP11 direcionou com sucesso YFP para cloroplastos de tabaco.

[0067] Em uma modalidade de exemplo adicional, um peptídeo TraP17 foi sintetizado de modo independente e fundido a uma proteína fluorescente verde (GFP) para produzir um polipeptídeo TraP17-GFP quimérico. Uma molécula de ácido nucleico codificando o polipeptídeo TraP17-GFP quimérico foi introduzida em um vetor binário, de tal modo que a sequência de ácido nucleico codificando TraP17-GFP foi ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10.

[0068] Em ainda uma modalidade de exemplo adicional, um vetor binário compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando TraP17-GFP ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10 foi transitoriamente transformado em milho (*Zea mays*) através de *Agrobacterium*. Microscopia confocal e análise por Western blot confirmou que

TraP17 direcionou com sucesso GFP para cloroplastos de milho.

[0069] Em uma modalidade de exemplo adicional, um peptídeo TraP18 foi sintetizado de modo independente e fundido a uma proteína fluorescente verde (GFP) para produzir um polipeptídeo TraP18-GFP quimérico. Uma molécula de ácido nucleico codificando o polipeptídeo TraP18-GFP quimérico foi introduzida em um vetor binário, de tal modo que a sequência de ácido nucleico codificando TraP18-GFP foi ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10.

[0070] Em ainda uma modalidade de exemplo adicional, um vetor binário compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando TraP18-GFP ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10 foi transitoriamente transformado em milho (*Zea mays*) e tabaco (*Nicotiana tabacum*) através de *Agrobacterium*. Microscopia confocal e análise por Western blot confirmou que TraP18 direcionou com sucesso GFP para cloroplastos de milho e de tabaco.

[0071] Em uma modalidade de exemplo adicional, um peptídeo TraP19 foi sintetizado de modo independente e fundido a uma proteína fluorescente verde (GFP) para produzir um polipeptídeo TraP19-GFP quimérico. Uma molécula de ácido nucleico codificando o polipeptídeo TraP19-GFP quimérico foi introduzida em um vetor binário, de tal modo que a sequência de ácido nucleico codificando TraP19-GFP foi ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10.

[0072] Em ainda uma modalidade de exemplo adicional, um vetor binário compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando TraP19-GFP ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10 foi transitoriamente transformado em milho (*Zea mays*) e tabaco (*Nicotiana tabacum*) através de *Agrobacterium*. Microscopia confocal e análise por Western blot confirmou que TraP19 direcionou com sucesso GFP para cloroplastos de milho e de tabaco.

[0073] Em uma modalidade de exemplo adicional, um peptídeo

TraP26 foi sintetizado de modo independente e fundido a uma proteína fluorescente verde (GFP) para produzir um polipeptídeo TraP26-GFP quimérico. Uma molécula de ácido nucleico codificando o polipeptídeo TraP26-GFP quimérico foi introduzida em um vetor binário, de tal modo que a sequência de ácido nucleico codificando TraP26-GFP foi ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10.

[0074] Em ainda uma modalidade de exemplo adicional, um vetor binário compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando TraP26-GFP ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10 foi transitoriamente transformado em tabaco (*Nicotiana tabacum*) através de *Agrobacterium*. Microscopia confocal e análise por Western blot confirmou que TraP26 direcionou com sucesso GFP para cloroplastos de tabaco.

[0075] Em uma modalidade de exemplo adicional, um peptídeo TraP27 foi sintetizado de modo independente e fundido a uma proteína fluorescente amarela (GFP) para produzir um polipeptídeo TraP27-GFP quimérico. Uma molécula de ácido nucleico codificando o polipeptídeo TraP27-GFP quimérico foi introduzida em um vetor binário, de tal modo que a sequência de ácido nucleico codificando TraP27-GFP foi ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10.

[0076] Em ainda uma modalidade de exemplo adicional, um vetor binário compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando TraP27-GFP ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10 foi transitoriamente transformado em tabaco (*Nicotiana tabacum*) através de *Agrobacterium*. Microscopia confocal e análise por Western blot confirmou que TraP27 direcionou com sucesso GFP para cloroplastos de tabaco.

[0077] Em uma modalidade de exemplo adicional, um peptídeo TraP28 foi sintetizado de modo independente e fundido a uma proteína fluorescente amarela (GFP) para produzir um polipeptídeo TraP28-

GFP quimérico. Uma molécula de ácido nucleico codificando o polipeptídeo TraP28-GFP quimérico foi introduzida em um vetor binário, de tal modo que a sequência de ácido nucleico codificando TraP28-GFP foi ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10.

[0078] Em ainda uma modalidade de exemplo adicional, um vetor binário compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando TraP28-GFP ligada operacionalmente a um promotor AtUbi 10 foi transitoriamente transformado em tabaco (*Nicotiana tabacum*) através de *Agrobacterium*. Microscopia confocal e análise por Western blot confirmou que TraP28 direcionou com sucesso GFP para cloroplastos de tabaco.

[0079] Em uma modalidade de exemplo adicional, sequências de ácido nucleico, cada uma codificando um peptídeo TraP sintético da invenção, foram sintetizadas de modo independente e ligadas operacionalmente a uma sequência de ácido nucleico codificando uma sequência genética agronomicamente importante. As sequências de TraP podem ser fundidas a traços tolerantes a herbicidas (por exemplo *dgt-28*, *dgt-14*, *dgt-32* e *dgt-33*) de modo a produzir moléculas de ácido nucleico sintéticas, cada uma codificando um polipeptídeo de fusão TraP10:DGT-28, TraP11:DGT-28, TraP17:DGT-28, TraP18:DGT-28, TraP19:DGT-28, TraP26:DGT-28, TraP27:DGT-28 ou TraP28:DGT-28 quimérico. As moléculas de ácido nucleico referidas, cada uma codificando um polipeptídeo TraP10:DGT-28, TraP11:DGT-28, TraP17:DGT-28, TraP18:DGT-28, TraP19:DGT-28, TraP26:DGT-28, TraP27:DGT-28 ou TraP28:DGT-28 quimérico, podem ser cada uma introduzidas em um vetor binário, de tal modo que cada sequência de ácido nucleico codificando TraP10:DGT-28, TraP11:DGT-28, TraP17:DGT-28, TraP18:DGT-28, TraP19:DGT-28, TraP26:DGT-28, TraP27:DGT-28 ou TraP28:DGT-28 foi ligada operacionalmente a um promotor e outros elementos reguladores genéticos. O vetor binário

contendo a sequência de ácido nucleico codificando TraP10:DGT-28, TraP11:DGT-28, TraP17:DGT-28, TraP18:DGT-28, TraP19:DGT-28, TraP26:DGT-28, TraP27:DGT-28 ou TraP28:DGT-28 foi usado para transformar várias espécies de plantas. As plantas transgênicas podem ser avaliadas para tolerância ao glifosato como um resultado da expressão e translocação das enzimas DGT-28 para o cloroplasto.

[0080] Em vista dos exemplos de elaboração detalhados mencionados acima, as sequências de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 da invenção podem ser usadas para direcionar qualquer polipeptídeo para um plastídeo em uma ampla gama de espécies de plantas. Por exemplo, pelos métodos tornados disponíveis para aqueles versados na técnica pela presente invenção, um polipeptídeo quimérico compreendendo uma sequência de peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 fundida ao N-término de qualquer segunda sequência de peptídeo pode ser introduzida em uma célula hospedeira para direcionamento para plastídeo da segunda sequência de peptídeo. Portanto, em modalidades particulares, um peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode proporcionar aumento da eficiência de importação e processamento de um peptídeo para o qual se deseja expressão de plastídeo.

II. Abreviações

CTP	peptídeo de trânsito de cloroplastos
EPSPS	3-enolpiruvilshikimato-5-fosfato sintase
YFP	proteína fluorescente amarela
T _i	indutor de tumor (plasmídeos derivados de <i>A. tumefaciens</i>)
T-DNA	DNA de transferência

III. Termos

[0081] De modo a facilitar a revisão das várias modalidades da presente invenção, são proporcionadas as explicações de termos es-

pecíficos que se seguem:

[0082] Peptídeo de trânsito de cloroplastos: Conforme usado aqui, o termo "peptídeo de trânsito de cloroplastos" (CTP) (ou "peptídeo de trânsito de plastídeos") pode se referir a uma sequência de aminoácidos que, quando presente no N-término de um polipeptídeo, direciona a importação do polipeptídeo para dentro de um plastídeo de uma célula de planta, por exemplo, um cloroplasto. Um CTP é geralmente necessário e suficiente para direcionar a importação de uma proteína para dentro de um plastídeo (por exemplo, um plastídeo primário, secundário, ou terciário, tal como um cloroplasto) de uma célula hospedeira. Um peptídeo de trânsito de cloroplastos putativo pode ser identificado por qualquer um de vários algoritmos disponíveis (por exemplo, PSORT, e ChloroP (disponíveis em www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP)). ChloroP pode proporcionar uma previsão particularmente boa de peptídeos de trânsito de cloroplastos. Emanuelsson *et al.* (1999), *Protein Science* 8:978-84. No entanto, a previsão de peptídeos de trânsito de cloroplastos funcionais não é obtido com 100% de eficiência por qualquer algoritmo existente. Portanto, é importante verificar que um peptídeo de trânsito de cloroplastos putativo identificado na verdade funciona conforme pretendido, por exemplo, em uma metodologia *in vitro*, ou *in vivo*.

[0083] Peptídeos de trânsito de cloroplastos podem estar localizados no N-término de um polipeptídeo que é importado para dentro de um plastídeo, e em alguns exemplos podem estar localizados no C-término de um polipeptídeo. O peptídeo de trânsito pode facilitar o transporte co-ou pós-translacional de um polipeptídeo compreendendo o CTP para dentro do plastídeo. Os peptídeos de trânsito de cloroplastos tipicamente compreendem entre cerca de 40 e cerca de 100 aminoácidos, e foi observado que os CTPs referidos contêm algumas características comuns, por exemplo, os CTPs contêm muitos poucos, se

qualquer, aminoácidos negativamente carregados (tais como ácido aspártico, ácido glutâmico, asparaginas, ou glutamina); as regiões de N-terminal de CTPs carecem de aminoácidos carregados, glicina, e prolina; a região central de um CTP também é provável de conter uma proporção muito elevada de aminoácidos básicos ou hidroxilados (tais como serina e treonina); e é provável que a região de C-terminal de um CTP seja rica em arginina, e tenha a capacidade de compreender uma estrutura de *beta-sheet* anfipática. Proteases de plastídeos podem clivar o CTP do remanescente de um polipeptídeo compreendendo o CTP depois de importação do polipeptídeo para dentro do plastídeo.

[0084] Contato: Conforme usado aqui, o termo "contato com" ou "captação por" uma célula, um tecido, ou um organismo (por exemplo, uma célula de planta; tecido de planta; e plant), com respeito a uma molécula de ácido nucleico, inclui internalização da molécula de ácido nucleico no organismo, por exemplo e sem limitação: contactando o organismo com uma composição compreendendo a molécula de ácido nucleico; e por imersão dos organismos com uma solução compreendendo a molécula de ácido nucleico.

[0085] Endógenas: Conforme usado aqui, o termo "endógenas" se refere a substâncias (por exemplo, moléculas de ácido nucleico e polipeptídeos) que se originam a partir de dentro de um organismo, um tecido, ou uma célula em particular. Por exemplo, um polipeptídeo "endógeno" expressado em uma célula de planta pode se referir a um polipeptídeo que é expressado normalmente em células do mesmo tipo de plantas não manipuladas geneticamente da mesma espécie.

[0086] Expressão: Conforme usado aqui, "expressão" de uma sequência codificante (por exemplo, um gene ou um transgene) se refere ao processo por meio do qual a informação codificada de uma unidade transcricional de ácido nucleico (incluindo, por exemplo, cDNA ou DNA

genômico) é convertida em uma parte operacional, não operacional, ou estrutural de uma célula, frequentemente incluindo a síntese de uma proteína. A expressão de um gene pode ser influenciada por sinais externos; por exemplo, exposição de uma célula, de um tecido, ou de um organismo a um agente que aumenta ou diminui a expressão de um gene. A expressão de um gene também pode ser regulada em qualquer lugar no caminho de DNA para RNA para proteína. Ocorre regulação da expressão de um gene, por exemplo, através de controles que agem sobre a transcrição, a translação, o transporte e o processamento de RNA, a degradação de moléculas intermediárias tais como mRNA, ou através de ativação, inativação, compartimentalização, ou degradação de moléculas de proteínas específicas depois de terem sido feitas, ou por combinações das mesmas. A expressão de um gene pode ser medida no nível de RNA ou no nível de proteína por qualquer método conhecido na técnica, incluindo, sem limitação, Northern blot, RT-PCR, Western blot, ou *in vitro*, *in situ*, ou um ou mais ensaios de atividade de proteína *in vivo*.

[0087] Material genético: Conforme usado aqui, o termo "material genético" inclui todos os genes, e moléculas de ácido nucleico, tais como DNA e RNA.

[0088] Heterólogas: Conforme usado aqui, o termo "heterólogas" se refere a substâncias (por exemplo, moléculas de ácido nucleico e polipeptídeos) que não se originam a partir de dentro de um organismo, um tecido, ou uma célula em particular. Por exemplo, um polipeptídeo "heterólogo" expressado em uma célula de planta pode se referir a um polipeptídeo que não é expressado normalmente em células do mesmo tipo de plantas não manipuladas geneticamente da mesma espécie (por exemplo, um polipeptídeo que é expressado em diferentes células do mesmo organismo ou células de um organismo diferente).

[0089] Isoladas: Conforme usado aqui, o termo "isoladas" se refere a moléculas (por exemplo, moléculas de ácido nucleico e polipeptídeos) que são substancialmente separadas ou purificadas a partir de outras moléculas do mesmo tipo (por exemplo, outras moléculas de ácido nucleico e outros polipeptídeos) com as quais a molécula é normalmente associada na célula do organismo no qual a molécula ocorre naturalmente. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico isolada pode ser substancialmente separada ou purificada a partir do DNA cromossômico ou DNA extracromossômico na célula do organismo no qual ocorre a molécula de ácido nucleico naturalmente. Deste modo, o termo inclui moléculas de ácido nucleico recombinantes e polipeptídeos que são bioquimicamente purificados de tal modo que outras moléculas de ácido nucleico, outros polipeptídeos, e outros componentes celulares sejam removidos. O termo também inclui moléculas de ácido nucleico recombinantes, moléculas de ácido nucleico quimicamente sintetizadas, e polipeptídeos produzidos de modo recombinante.

[0090] O termo "substancialmente purificado," conforme usado aqui, se refere a uma molécula que é separada de outras moléculas normalmente associadas com a mesma em seu estado nativo. Uma molécula substancialmente purificada pode ser a espécie predominante presente em uma composição. Uma molécula substancialmente purificada pode ser, por exemplo, no mínimo 60% livre, no mínimo 75% livre, ou no mínimo 90% livre de outras moléculas além de um solvente presente em uma mistura natural. O termo "substancialmente purificada" não se refere a moléculas presentes em seu estado nativo.

[0091] Molécula de ácido nucleico: Conforme usado aqui, o termo "molécula de ácido nucleico" se refere a uma forma polimérica de nucleotídeos, os quais podem incluir tanto filamentos de sentido quanto anti-sense de RNA, cDNA, DNA genômico, e formas sintéticas e polímeros mistos dos acima. Um nucleotídeo pode se referir a um ribonu-

cleotídeo, um desoxirribonucleotídeo, ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleotídeo. Uma "molécula de ácido nucleico" conforme usado aqui, é sinônima com "ácido nucleico" e "polinucleotídeo." Uma molécula de ácido nucleico tem geralmente no mínimo 10 bases de extensão, a menos que especificado de modo diverso. O termo inclui formas de DNA de filamento único e de filamento duplo. Moléculas de ácido nucleico incluem formas diméricas (denominadas in tandem), e os produtos de transcrição de moléculas de ácido nucleico. Uma molécula de ácido nucleico pode incluir um ou outro ou ambos os nucleotídeos que ocorrem naturalmente e modificados ligados juntos por ligações de nucleotídeos que ocorrem naturalmente e/ou que não ocorrem naturalmente.

[0092] Moléculas de ácido nucleico podem ser modificadas quimicamente ou bioquimicamente, ou podem conter bases de nucleotídeo não naturais ou derivatizadas, conforme será prontamente reconhecido por aqueles versados na técnica. As modificações referidas incluem, por exemplo, etiquetas, metilação, substituição de um ou mais dos nucleotídeos que ocorrem naturalmente com um análogo, modificações internucleotídeos (por exemplo, ligações não carregadas: por exemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.; ligações carregadas: por exemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.; porções pendentes: por exemplo, peptídeos; intercaladores: por exemplo, acridina, psoraleno, etc.; quelantes; alquiladores; e ligações modificadas: por exemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). O termo "molécula de ácido nucleico" também inclui qualquer conformação topológica, incluindo conformações de filamento único, de filamento duplo, parcialmente duplexada, triplexada, *hairpinned*, circular, e *padlocked*.

[0093] Conforme usado aqui, com respeito a DNA, o termo "sequência codificante," "sequência de nucleotídeos estruturais," ou "mo-

lécula de ácido nucleico estrutural" se refere a uma sequência de nucleotídeos que é em última análise traduzida em um polipeptídeo, através de transcrição e mRNA, quando colocada sob o controle de sequências reguladoras apropriadas. Com respeito a RNA, o termo "sequência codificante" se refere a uma sequência de nucleotídeos que é traduzida em um peptídeo, em um polipeptídeo, ou em uma proteína. Os limiares de uma sequência codificante são determinados por um códon de início de translação no 5'-término e um códon de parada de translação no 3'-terminus. Sequências codificantes incluem, mas não estão limitadas a: DNA genômico; cDNA; ESTs; e sequências de nucleotídeos recombinantes.

[0094] Em algumas modalidades, a invenção inclui sequências de nucleotídeos que podem ser isoladas, purificadas, ou parcialmente purificadas, por exemplo, usando métodos de separação tais como, por exemplo, cromatografia de permuta iônica; por exclusão com base no tamanho molecular ou por afinidade; por técnicas de fracionamento com base na solubilidade em diferentes solventes; ou métodos de engenharia genética tais como amplificação, clonagem, e subclonagem.

[0095] Identidade de sequência: O termo "identidade de sequência" ou "identidade," conforme usado aqui, no contexto de duas sequências de ácido nucleico ou polipeptídeo, pode se referir aos resíduos nas duas sequências que são as mesmas quando alinhadas para máxima correspondência sobre uma janela de comparação especificada.

[0096] Conforme usado aqui, o termo "percentagem de identidade de sequência" pode se referir ao valor determinado comparando duas sequências alinhadas otimamente (por exemplo, sequências de ácido nucleico, e sequências de aminoácidos) sobre uma janela de comparação, em que a porção da sequência na janela de comparação podem compreender adições ou eliminações (isto é, intervalos) em com-

paração com a sequência de referência (a qual não compreende adições ou eliminações) para ótimo alinhamento das duas sequências. A percentagem é calculada determinando o número de posições nas quais o nucleotídeo idêntico ou o resíduo aminoácido idêntico ocorre em ambas as sequências para produzir o número de posições correspondentes, dividindo o número de posições correspondentes pelo número total de posições na janela de comparação, e multiplicando o resultado por 100 para produzir a percentagem de identidade de sequência.

[0097] Métodos para alinhamento de sequências para comparação são de conhecimento geral na técnica. Vários programas e algoritmos de alinhamento são descritos, por exemplo: em Smith and Waterman (1981), *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman and Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson and Lipman (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444; Higgins and Sharp (1988), *Gene* 73:237-44; Higgins and Sharp (1989), *CABIOS* 5:151-3; Corpet *et al.* (1988), *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang *et al.* (1992), *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65; Pearson *et al.* (1994), *Methods Mol. Biol.* 24:307-31; Tatiana *et al.* (1999), *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50. Uma consideração detalhada de métodos de alinhamento de sequências e cálculos de homologia pode ser encontrada, por exemplo, em Altschul *et al.* (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

[0098] A ferramenta BLAST™ (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST™; Altschul *et al.* (1990)) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) está disponível em várias fontes, incluindo o National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD), e na internet, para uso em conexão com vários programas de análise de sequências. Uma descrição de como determinar a identidade de sequências usando este programa está disponível na internet na seção "help" para BLAST™. Para comparações de sequências de ácido nucleico, a fun-

ção "Blast 2 sequences" do programa BLAST™ (Blastn) pode ser empregada para configurar para parâmetros default. Sequências de ácido nucleico com similaridade ainda maior com as sequências de referência vão apresentar percentagem de identidade crescente quando avaliadas por este método.

[0099] Especificamente hibridizável/Especificamente complementar: Conforme usado aqui, os termos "Especificamente hibridizável" e "especificamente complementar" são termos que indicam um grau suficiente de complementaridade tal que ocorre ligação estável e específica entre a molécula de ácido nucleico e uma molécula de ácido nucleico alvo. A hibridização entre duas moléculas de ácido nucleico envolve a formação de um alinhamento anti-paralelo entre as sequências de ácido nucleico das duas moléculas de ácido nucleico. As duas moléculas são então capazes de formar ligações de hidrogênio com bases correspondentes sobre o filamento oposto para formar uma molécula duplex que, se for suficientemente estável, é detectável usando métodos de conhecimento geral na técnica. Uma molécula de ácido nucleico não precisa ser 100% complementar a sua sequência alvo para ser especificamente hibridizável. No entanto, a quantidade de complementaridade de sequência que deve existir para hibridização para ser específica é uma função das condições de hibridização usadas.

[00100] As condições de hibridização resultando em graus de estrringência particulares vão variar dependendo da natureza do método de hibridização de escolha e da composição e do comprimento das sequências de ácido nucleico de hibridização. De modo geral, a temperatura de hibridização e a força iônica (especialmente a concentração de Na^+ e/ou Mg^{++}) do tampão de hibridização vão determinar a estrringência de hibridização, embora os tempos de lavagem também influenciem a estrringência. Cálculos relativos às condições de hibridi-

zação requeridas para atingir graus particulares de estringência são conhecidos por aqueles com conhecimento ordinário na técnica, e são discutidos, por exemplo, in Sambrook *et al.* (ed.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9 e 11; e Hames and Higgins (eds.) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, 1985. Instrução e orientação detalhadas adicionais com respeito à hibridização de ácidos nucleicos podem ser encontradas, por exemplo, em Tijssen, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993; e Ausubel *et al.*, Eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2, Greene Publishing e Wiley-Interscience, NY, 1995.

[00101] Conforme usado aqui, "condições estringentes" englobam condições sob as quais somente vai ocorrer hibridização se houver menos de 20% de incompatibilidade entre a molécula de hibridização e uma sequência homólogo dentro da molécula de ácido nucleico alvo. "Condições estringentes" incluem níveis particulares adicionais de estringência. Deste modo, conforme usado aqui, condições de "moderada estringência" são aqueles sob as quais moléculas com mais de 20% de incompatibilidade de sequência não vão hibridizar; condições de "alta estringência" são aquelas sob as quais sequências com mais de 10% de incompatibilidade não vão hibridizar; e condições de "estringência muito elevada" são aquelas sob as quais sequências com mais de 5% de incompatibilidade não vão hibridizar.

[00102] As seguintes são condições de hibridização representativas, não limitantes.

[00103] Condição de elevada estringência (detecta sequências que partilham no mínimo 90% de identidade de sequência): Hibridização

em 5x SSC, .1% de tampão SDS a 65°C por 16 horas; lavagem duas vezes em 2x SSC, .1% de tampão SDS em temperatura ambiente por 15 minutos cada; e lavagem duas vezes em 0,5x SSC, .1% de tampão SDS a 65°C por 20 minutos cada.

[00104] Condição de moderada estringência (detecta sequências que partilham no mínimo 80% de identidade de sequência): Hibridização em 5x-6x SSC, .1% de tampão SDS a 65 a 70°C por 16 a 20 horas; lavagem duas vezes em 2x SSC, .1% de tampão SDS em temperatura ambiente por 5 a 20 minutos cada; e lavagem duas vezes em 1x SSC, .1% de tampão SDS a 55 a 70°C por 30 minutos cada.

[00105] Condição de controle não estrigente (sequências que partilham no mínimo 50% de identidade de sequência vão hibridizar): Hibridização em 6x SSC, .1% de tampão SDS em temperatura ambiente até 55°C por 16 a 20 horas; lavagem no mínimo duas vezes em 2x-3x SSC, .1% de tampão SDS em temperatura até 55°C por 20 a 30 minutos cada.

[00106] Conforme usado aqui, o termo "substancialmente homóloga" ou "substancial homologia," com respeito a uma sequência de ácido nucleico contígua, se refere a sequências de nucleotídeos contíguas que hibridizam sob condições estringentes à sequência de ácido nucleico de referência. Por exemplo, sequências de ácido nucleico que são substancialmente homólogas a uma sequência de ácido nucleico de referência de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 e SEQ ID NO: 16 são as sequências de ácido nucleico que hibridizam sob condições estringentes (por exemplo, as condições de Estringência Moderada estipuladas, acima) à sequência de ácido nucleico de referência de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 e SEQ ID NO: 16. Sequências substancialmente homólogas podem ter no mínimo 80%

de identidade de sequência. Por exemplo, sequências substancialmente homólogas podem ter a partir de cerca de 80% a 100% de identidade de sequência, tal como cerca de 81%; cerca de 82%; cerca de 83%; cerca de 84%; cerca de 85%; cerca de 86%; cerca de 87%; cerca de 88%; cerca de 89%; cerca de 90%; cerca de 91%; cerca de 92%; cerca de 93%; cerca de 94% cerca de 95%; cerca de 96%; cerca de 97%; cerca de 98%; cerca de 98.5%; cerca de 99%; cerca de 99.5%; e cerca de 100%. A propriedade de substancial homologia está intimamente relacionada com hibridização específica. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico é especificamente hibridizável quando há um grau de complementaridade suficiente de modo a evitar ligação inespecífica do ácido nucleico a sequências não alvo sob condições em que se deseja ligação específica, por exemplo, sob condições de hibridização estridentes.

[00107] Conforme usado aqui, o termo "ortólogo" se refere a um gene em duas ou mais espécies que evoluiu a partir de uma sequência de nucleotídeos de ancestral comum, e pode conservar a mesma função nas duas ou mais espécies.

[00108] Conforme usado aqui, diz-se que duas moléculas de sequências de ácido nucleico apresentam "completa complementaridade" quando cada nucleotídeo de uma sequência lida na direção 5' a 3' é complementar a cada nucleotídeo da outra sequência quando lida na direção 3' a 5'. Uma sequência de nucleotídeos que é completamente complementar a uma sequência de nucleotídeos de referência vai apresentar uma sequência idêntica à sequência de complemento reverso da sequência de nucleotídeos de referência. Estes termos e descrições são bem definidos na técnica e são facilmente entendidos por aqueles com conhecimento ordinário na técnica.

[00109] Ao determinar a percentagem de identidade de sequência entre sequências de aminoácidos, é de conhecimento geral por aque-

les versados na técnica que a identidade do aminoácido em uma dada posição proporcionada por um alinhamento pode diferir sem afetar propriedades desejadas dos polipeptídeos compreendendo as sequências alinhadas. Nestes casos, a percentagem de identidade de sequência pode ser ajustada para explicar a similaridade entre aminoácidos substituídos conservadoramente. Estes ajustes são de conhecimento geral e são comumente usados por aqueles versados na técnica. Vide, por exemplo, Myers and Miller (1988), *Computer Applications in Biosciences* 4:11-7.

[00110] Deste modo, modalidades da invenção incluem variantes funcionais de sequências de aminoácidos de peptídeos de trânsito de plastídeos exemplares, e sequências de ácido nucleico codificando as mesmas. Uma variante funcional de uma sequência de peptídeo de trânsito exemplar pode ser, por exemplo, um fragmento de uma sequência de aminoácidos de peptídeo de trânsito de exemplo (tal como um fragmento N-terminal ou C-terminal), ou uma sequência modificada de uma sequência de aminoácidos de peptídeo de trânsito de exemplo de comprimento total ou fragmento de uma sequência de aminoácidos de peptídeo de trânsito de exemplo. Uma sequência de aminoácidos de peptídeo de trânsito de exemplo pode ser modificada em algumas modalidades introduzindo uma ou mais substituições de aminoácidos conservadoras. Uma substituição de aminoácido "conservadora" é uma substituição de aminoácido na qual o resíduo aminoácido é substituído por um resíduo aminoácido que tem uma cadeia lateral funcional similar, um tamanho similar, e/ou uma hidrofobicidade similar. Famílias de aminoácidos que podem ser usadas para substituir outro aminoácido da mesma família de modo a introduzir uma substituição conservadora são conhecidas na técnica. Por exemplo, estas famílias de aminoácidos incluem: aminoácidos básicos (por exemplo, lisina, arginina, e histidina); aminoácidos acidíferos (por exemplo, ácido aspá-

rtico e ácido glutâmico); aminoácidos polares não carregados (em pH fisiológico) (por exemplo, glicina, asparaginas, glutamina, serina, treonina, tirosina, e citosina); aminoácidos não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, e triptofano); aminoácidos beta-ramificados (por exemplo, treonina, valina, e isoleucina); e aminoácidos aromáticos (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, e histidina). Vide, por exemplo, Sambrook *et al.* (Eds.), *supra*; e Innis *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1990, Academic Press, NY, USA.

[00111] Ligada operacionalmente: Uma primeira sequência de nucleotídeos é "ligada operacionalmente" com uma segunda sequência de nucleotídeos quando a primeira sequência de nucleotídeos está em uma relação funcional com a segunda sequência de nucleotídeos. Por exemplo, um promotor é ligado operacionalmente a uma sequência codificante se o promotor afetar a transcrição ou expressão da sequência codificante. Quando produzidas de modo recombinante, sequências de nucleotídeos ligadas operacionalmente geralmente são contíguas e, onde necessário para unir duas regiões de codificação de proteínas, no mesmo frame de leitura. No entanto, as sequências de nucleotídeos não precisam ser contíguas para serem ligadas operacionalmente.

[00112] O termo, "ligadas operacionalmente," quando usado em referência a uma sequência reguladora e uma sequência codificante, significa que a sequência reguladora afeta a expressão da sequência codificante ligada. "Sequências reguladoras," ou "elementos de controle," se referem a sequências de nucleotídeos que influenciam o momento e o nível/a quantidade de transcrição, o processamento de RNA ou a estabilidade, ou a translação da sequência codificante associada. Sequências reguladoras podem incluir promotores; sequências líderes de translação; íntrons; reforçadores; estruturas de haste-laço (*stem-*

loop); sequências de ligação de repressores; sequências de terminação; sequências de reconhecimento de poliadenilação; etc. Sequências reguladoras particulares podem estar localizadas a montante e/ou a jusante de uma sequência codificante ligada operacionalmente à mesma. Além disso, sequências reguladoras particulares ligadas operacionalmente a uma sequência codificante podem estar localizadas sobre o filamento complementar associado de uma molécula de ácido nucleico de filamento duplo.

[00113] Promotor: Conforme usado aqui, o termo "promotor" se refere a uma região de DNA que pode estar a montante do início de transcrição, e que pode estar envolvida no reconhecimento e na ligação de RNA polimerase e outras proteínas para iniciar transcrição. Um promotor pode ser ligado operacionalmente a uma sequência codificante para expressão em uma célula, ou um promotor pode ser ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos codificando uma sequência de sinal a qual pode ser ligada operacionalmente a uma sequência codificante para expressão em uma célula. Um "promotor de planta" pode ser um promotor capaz de iniciar transcrição em células de plantas. Exemplos de promotores sob controle de desenvolvimento incluem promotores que preferencialmente iniciam transcrição em determinados tecidos, tais como folhas, raízes, sementes, fibras, vasos do xilema, traqueídeos, ou esclerênquima. Os promotores referidos são referidos como "tecido-preferenciais." Promotores os quais iniciam transcrição somente em determinados tecidos são referidos como "tecido-específicos." Um promotor "tipo celular-específico" essencialmente dirige a expressão em determinados tipos celulares em um ou mais órgãos, por exemplo, células vasculares em raízes ou folhas. Um promotor "indutível" pode ser um promotor o qual pode estar sob controle ambiental. Exemplos de condições ambientais que podem iniciar transcrição por promotores indutíveis incluem condições anaeróbicas e

a presença de luz. Promotores tecido-específicos, tecido-preferencial, tipo celular específico, e indutíveis constituem a classe de promotores "não constitutivos". Um promotor "constitutivo" é um promotor o qual pode ser ativo sob condições as mais ambientais.

[00114] Qualquer promotor indutível pode ser usado em algumas modalidades da invenção. Vide Ward *et al.* (1993), *Plant Mol. Biol.* 22:361-366. Com um promotor indutível, a taxa de transcrição aumenta em resposta a um agente indutor. Exemplos de promotores indutíveis incluem, mas não estão limitados a: Promotores do sistema ACEI que responde ao cobre; gene *In2* do milho que responde a fitoprotetores de herbicidas de benzenossulfonamida; repressor Tet de Tn10; e o promotor indutível de um gene do hormônio esteroide, cuja atividade transcricional pode ser induzida por um hormônio glicocorticosteroide (Schena *et al.* (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:0421).

[00115] Exemplos de promotores constitutivos incluem, mas não estão limitados a: Promotores de vírus de plantas, tais como o promotor 35S do CaMV; promotores dos genes da actina do arroz; promotores de ubiquitina; pEMU; MAS; o promotor da H3 histona do milho; e o promotor de ALS, Xba1/NcoI fragmento 5' para o gene estrutural *ALS3* de *Brassica napus* (ou uma similaridade de sequência de nucleotídeos ao referido fragmento Xba1/NcoI) (Publicação do Pedido de Patente Internacional No. WO 96/30530).

[00116] Adicionalmente, qualquer promotor tecido-específico ou tecido-preferencial pode ser utilizado em algumas modalidades da invenção. Plantas transformadas com uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência codificante ligada operacionalmente a um promotor tecido-específico pode produzir o produto da sequência codificante exclusivamente, ou preferencialmente, em um tecido específico. Exemplos de promotores tecido-específicos ou tecido-preferenciais incluem, mas não estão limitados a: Um promotor raiz-

preferencial, tal como o do gene da faseolina; um promotor foliar específico e induzido pela luz tal como o de *cab* ou *rubisco*; um promotor antera-específico tal como o de *LAT52*; um promotor pólen-específico tal como o de *Zm13*; e um promotor microsporo-preferencial tal como o de *apg*.

[00117] Transformação: Conforme usado aqui, o termo "transformação" ou "transdução" se refere à transferência de uma ou mais moléculas de ácido nucleico para dentro de uma célula. Uma célula é "transformada" por uma molécula de ácido nucleico transduida para dentro da célula quando a molécula de ácido nucleico se torna replicada de modo estável pela célula, quer por incorporação da molécula de ácido nucleico para dentro do genoma celular, ou por replicação episômica. Conforme usado aqui, o termo "transformação" engloba todas as técnicas pelas quais uma molécula de ácido nucleico pode ser introduzida dentro de uma célula semelhante. Exemplos incluem, mas não estão limitados a: transfecção com vetores virais; transformação com vetores de plasmídeo; eletroporação (Fromm *et al.* (1986), *Nature* 319:791-3); lipofecção (Felgner *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7); microinjeção (Mueller *et al.* (1978), *Cell* 15:579-85); transferência mediada por *Agrobacterium* (Fraley *et al.* (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7); captação de DNA direta; e bombardeamento de microprojéteis (Klein *et al.* (1987), *Nature* 327:70).

[00118] Transgene: Uma sequência de ácido nucleico exógena. Em alguns exemplos, um transgene pode ser uma sequência que codifica um polipeptídeo que compreende no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28. Em exemplos particulares, um transgene pode codificar um polipeptídeo que compreende no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 e no mínimo uma sequência de peptídeo

adicional (por exemplo, uma sequência de peptídeo que confere resistência a herbicidas), para a qual é desejável a expressão do plastídeo. Nestes e em outros exemplos, um transgene pode conter sequências reguladoras ligadas operacionalmente a uma sequência codificante do transgene (por exemplo, um promotor). Para os fins da presente invenção, o termo "transgênico" quando usado para se referir a um organismo (por exemplo, uma planta), se refere a um organismo que compreende a sequência de ácido nucleico exógena. Em alguns exemplos, o organismo que compreende a sequência de ácido nucleico exógena pode ser um organismo no qual a sequência de ácido nucleico foi introduzida através de técnicas de transformação molecular. Em outros exemplos, o organismo que compreende a sequência de ácido nucleico exógena pode ser um organismo no qual a sequência de ácido nucleico foi introduzida por, por exemplo, introgressão ou polinização cruzada em uma planta.

[00119] Transporte: Conforme usado aqui, os termos "transporte(s)," "alvo(s)," e "transferência(s)" referem-se à propriedade de determinadas sequências de aminoácidos da invenção que facilita o movimento de um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos do núcleo de uma célula hospedeira para dentro de um plastídeo da célula hospedeira. Em modalidades particulares, uma sequência de aminoácidos semelhante (isto é, um CTP) pode ser capaz de transportar cerca de 100%, no mínimo cerca de 95%, no mínimo cerca de 90%, no mínimo cerca de 85%, no mínimo cerca de 80%, no mínimo cerca de 70%, no mínimo cerca de 60%, e/ou no mínimo cerca de 50% de um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos para dentro de plastídeos de uma célula hospedeira.

[00120] Vetor: Uma molécula de ácido nucleico conforme introduzida dentro de uma célula, por exemplo, para produzir uma célula transformada. Um vetor pode incluir sequências de ácido nucleico que per-

mitem que este replique na célula hospedeira, tal como uma origem de replicação. Exemplos de vetores incluem, mas não estão limitados a: um plasmídeo; um cosmídeo; um bacteriófago; ou um vírus que carrega DNA exógeno para dentro de uma célula. Um vetor também pode incluir um ou mais genes, moléculas antisense, e/ou genes marcadores selecionáveis e outros elementos genéticos conhecidos na técnica. Um vetor pode transduzir, transformar, ou infectar uma célula, deste modo fazendo com que a célula expresse as moléculas de ácido nucleico e/ou proteínas codificadas pelo vetor. Um vetor opcionalmente inclui materiais para ajudar a realizar o ingresso da molécula de ácido nucleico dentro da célula (por exemplo, um lipossoma, um revestimento de proteína, etc.).

[00121] A menos que especificamente indicado ou implícito, os termos "um," "uma," e "o", "a" significam "no mínimo um," conforme usado aqui.

[00122] A menos que especificamente explicado de modo diverso, todos os termos técnicos e científicos usados aqui, têm o mesmo significado conforme comumente entendido por aqueles com conhecimento ordinário na técnica à qual pertence esta invenção. Definições de termos comuns em biologia molecular podem ser encontradas, por exemplo, em Lewin B., *Genes V*, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); e Meyers R.A. (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Referência*, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Todas as percentagens são em peso e todas as proporções de misturas de solventes são por volume a menos que mencionado de modo diverso. Todas as temperaturas são em graus Celsius.

IV. Moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência codificante de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27,

ou TraP28

[00123] Em algumas modalidades, a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10 ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse. Em outras modalidades, a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP11 ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse. Em outras modalidades, a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP17 ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse. Em outras modalidades, a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP18 ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse. Em outras modalidades, a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP19 ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse. Em outras modalidades, a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP26 ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse. Em outras modalidades, a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP27 ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interes-

se. Em outras modalidades, a presente invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP28 ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse.

[00124] Em modalidades particulares, a sequência de nucleotídeos de interesse pode ser uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo de interesse. Em modalidades particulares, é proporcionada uma única molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo em que uma sequência de peptídeo TraP10 é fundida ao N-término de um polipeptídeo de interesse. Em modalidades particulares, é proporcionada uma única molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo em que uma sequência de peptídeo TraP11 é fundida ao N-término de um polipeptídeo de interesse. Em modalidades particulares, é proporcionada uma única molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo em que uma sequência de peptídeo TraP17 é fundida ao N-término de um polipeptídeo de interesse. Em modalidades particulares, é proporcionada uma única molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo em que uma sequência de peptídeo TraP18 é fundida ao N-término de um polipeptídeo de interesse. Em modalidades particulares, é proporcionada uma única molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo em que uma sequência de peptídeo TraP19 é fundida ao N-término de um polipeptídeo de interesse. Em modalidades particulares, é proporcionada uma única molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo em que uma sequência de peptídeo TraP26 é fundida ao N-término de um polipeptídeo de interesse. Em modalidades particulares, é proporcionada uma única molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo em que uma sequência de peptídeo TraP27 é fundida ao N-término de um polipeptídeo de interesse. Em modalidades particulares, é proporcionada

uma única molécula de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo em que uma sequência de peptídeo TraP28 é fundida ao N-término de um polipeptídeo de interesse.

[00125] Em moléculas de ácido nucleico proporcionadas em algumas modalidades da invenção, o último códon de uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 e o primeiro códon de uma sequência de nucleotídeos de interesse podem ser separados por qualquer número de tripletos de nucleotídeos, por exemplo, sem coding for um "STOP" codon. Em alguns exemplos, uma sequência codificando os primeiros aminoácidos de uma proteína madura normalmente associada com um peptídeo de trânsito em um polipeptídeo precursor natural pode estar presente entre o último códon de uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 e o primeiro códon de uma sequência de nucleotídeos de interesse. Uma sequência separando uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 e o primeiro códon de uma sequência de nucleotídeos de interesse pode, por exemplo, consistir de qualquer sequência, de tal modo que não é provável que a sequência de aminoácidos codificada altere significativamente a tradução do polipeptídeo quimérico e sua translocação para um plastídeo. Nestas modalidades e em modalidades adicionais, o último códon de uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser fundido em fase-registro (*in phase-register*) com o primeiro códon da sequência de nucleotídeos de interesse diretamente contígua a este, ou separado da mesma por não mais de uma sequência de peptídeo curta, tal

como a codificada por um encadeador de nucleotídeos sintético (por exemplo, um encadeador de nucleotídeos que pode ter sido usado para obter a fusão).

[00126] Em algumas modalidades, pode ser desejável modificar os nucleotídeos de uma sequência de nucleotídeos de interesse e/ou de uma sequência codificante de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 fundida a esta em uma única sequência codificante, por exemplo, para reforçar a expressão da sequência codificante em um hospedeiro particular. O código genético é redundante com 64 códons possíveis, porém a maioria dos organismos preferencialmente usam um subgrupo destes códons. Os códons que são utilizados o mais frequentemente em uma espécie são denominados códons ótimos, e os não utilizados com muita frequência são classificados como códons raros ou de baixo uso. Zhang *et al.* (1991), *Gene* 105:61-72. Os códons podem ser substituídos para refletir o uso de códons preferencial de um hospedeiro particular em um processo algumas vezes referido como "otimização de códons." Sequências codificantes otimizadas contendo códons preferenciais por um hospedeiro procariótico ou eucariótico em particular podem ser preparadas, por exemplo, para aumentar a taxa de translação ou para produzir transcritos de RNA recombinantes tendo propriedades desejáveis (por exemplo, uma meia-vida mais longa, em comparação com transcritos produzidos a partir de uma sequência não otimizada).

[00127] Algumas modalidades incluem variantes funcionais de TraP10. Variantes funcionais de TraP10 incluem, por exemplo e sem limitação: homólogos e ortólogos do peptídeo TraP10 estipulado como SEQ ID NO: 1; peptídeos de trânsito de cloroplastos que compreendem uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 1; peptídeos TraP10 truncados; peptídeos de trânsito de cloroplastos mais longos que compreendem uma sequência de aminoácidos contí-

gua dentro da SEQ ID NO: 1; peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 1 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos conservadoras; e peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 1 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos não conservadoras que são demonstradas para direcionar um peptídeo ligado operacionalmente para um plastídeo em uma célula contendo plastídeo.

[00128] Algumas modalidades incluem variantes funcionais de TraP11. Variantes funcionais de TraP11 incluem, por exemplo e sem limitação: homólogos e ortólogos do peptídeo TraP11 estipulado como SEQ ID NO: 2; peptídeos de trânsito de cloroplastos que compreendem uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 2; peptídeos TraP11 truncados; peptídeos de trânsito de cloroplastos mais longos que compreendem uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 2; peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 2 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos conservadoras; e peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 2 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos não conservadoras que são demonstradas para direcionar um peptídeo ligado operacionalmente para um plastídeo em uma célula contendo plastídeo.

[00129] Algumas modalidades incluem variantes funcionais de TraP17. Variantes funcionais de TraP17 incluem, por exemplo e sem limitação: homólogos e ortólogos do peptídeo TraP17 estipulado como SEQ ID NO: 3; peptídeos de trânsito de cloroplastos que compreendem uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 3; peptídeos TraP17 truncados; peptídeos de trânsito de cloroplastos mais longos que compreendem uma sequência de aminoácidos contí-

gua dentro da SEQ ID NO: 3; peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 3 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos conservadoras; e peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 3 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos não conservadoras que são demonstradas para direcionar um peptídeo ligado operacionalmente para um plastídeo em uma célula contendo plastídeo.

[00130] Algumas modalidades incluem variantes funcionais de TraP18. Variantes funcionais de TraP18 incluem, por exemplo e sem limitação: homólogos e ortólogos do peptídeo TraP18 estipulado como SEQ ID NO: 4; peptídeos de trânsito de cloroplastos que compreendem uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 4; peptídeos TraP18 truncados; peptídeos de trânsito de cloroplastos mais longos que compreendem uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 4; peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 4 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos conservadoras; e peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 4 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos não conservadoras que são demonstradas para direcionar um peptídeo ligado operacionalmente para um plastídeo em uma célula contendo plastídeo.

[00131] Algumas modalidades incluem variantes funcionais de TraP19. Variantes funcionais de TraP19 incluem, por exemplo e sem limitação: homólogos e ortólogos do peptídeo TraP19 estipulado como SEQ ID NO: 5; peptídeos de trânsito de cloroplastos que compreendem uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 5; peptídeos TraP19 truncados; peptídeos de trânsito de cloroplastos mais longos que compreendem uma sequência de aminoácidos contí-

gua dentro da SEQ ID NO: 5; peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 5 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos conservadoras; e peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 5 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos não conservadoras que são demonstradas para direcionar um peptídeo ligado operacionalmente para um plastídeo em uma célula contendo plastídeo.

[00132] Algumas modalidades incluem variantes funcionais de TraP26. Variantes funcionais de TraP26 incluem, por exemplo e sem limitação: homólogos e ortólogos do peptídeo TraP26 estipulado como SEQ ID NO: 6; peptídeos de trânsito de cloroplastos que compreendem uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 6; peptídeos TraP26 truncados; peptídeos de trânsito de cloroplastos mais longos que compreendem uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 6; peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 6 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos conservadoras; e peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 6 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos não conservadoras que são demonstradas para direcionar um peptídeo ligado operacionalmente para um plastídeo em uma célula contendo plastídeo.

[00133] Algumas modalidades incluem variantes funcionais de TraP27. Variantes funcionais de TraP27 incluem, por exemplo e sem limitação: homólogos e ortólogos do peptídeo TraP27 estipulado como SEQ ID NO: 7; peptídeos de trânsito de cloroplastos que compreendem uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 7; peptídeos TraP27 truncados; peptídeos de trânsito de cloroplastos mais longos que compreendem uma sequência de aminoácidos contí-

gua dentro da SEQ ID NO: 7; peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 7 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos conservadoras; e peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 7 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos não conservadoras que são demonstradas para direcionar um peptídeo ligado operacionalmente para um plastídeo em uma célula contendo plastídeo.

[00134] Algumas modalidades incluem variantes funcionais de TraP28. Variantes funcionais de TraP28 incluem, por exemplo e sem limitação: homólogos e ortólogos do peptídeo TraP28 estipulado como SEQ ID NO: 8; peptídeos de trânsito de cloroplastos que compreendem uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 8; peptídeos TraP28 truncados; peptídeos de trânsito de cloroplastos mais longos que compreendem uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 8; peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 8 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos conservadoras; e peptídeos de trânsito de cloroplastos compreendendo uma sequência de aminoácidos contígua dentro da SEQ ID NO: 8 que tem uma ou mais substituições de aminoácidos não conservadoras que são demonstradas para direcionar um peptídeo ligado operacionalmente para um plastídeo em uma célula contendo plastídeo.

[00135] Algumas modalidades da invenção também incluem uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28. As moléculas de ácido nucleico referidas podem ser úteis, por exemplo, para facilitar a manipulação da sequência codificante de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 em técnicas de biologia molecular. Por

exemplo, em algumas modalidades, uma sequência codificante de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser introduzida em um vetor adequado para sub-clonagem da sequência em um vetor de expressão, ou uma sequência codificante de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser introduzida em uma molécula de ácido nucleico que facilita a produção de uma molécula de ácido nucleico adicional compreendendo a sequência codificante de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 ligada operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse.

[00136] Em exemplos particulares, um peptídeo TraP10 é igual a ou tem menos de 72 aminoácidos de comprimento. Por exemplo, um peptídeo TraP10 pode ter 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62 ou menos aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP10 compreende a sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 1, ou uma variante funcional da mesma. Deste modo, um peptídeo TraP10 pode compreender uma sequência de aminoácidos compreendendo a SEQ ID NO: 1, ou uma variante funcional da mesma, em que o comprimento do peptídeo TraP10 ou variante funcional do mesmo é igual a ou tem menos de 72 aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP10 ou variante funcional do mesmo pode compreender uma sequência de aminoácidos que é, por exemplo, no mínimo 80%, no mínimo 85%, no mínimo 90%, no mínimo 92%, no mínimo 94%, no mínimo 95%, no mínimo 96%, no mínimo 97%, no mínimo 98%, no mínimo 99%, ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 1.

[00137] Todas as sequências de nucleotídeos que codificam, por exemplo, o peptídeo TraP10 de SEQ ID NO: 1, ou variantes funcionais das mesmas compreendendo menos do que a sequência inteira de SEQ ID NO: 1, vão ser imediatamente reconhecíveis por aqueles ver-

sados na técnica. A degeneração do código genético proporciona um número finito de sequências de codificação para uma sequência de aminoácidos em particular. A seleção de uma sequência em particular para codificar um peptídeo TraP10 está dentro do critério do profissional. Diferentes sequências de codificação podem ser desejáveis em diferentes aplicações. Por exemplo, de modo a aumentar a expressão do peptídeo TraP10 em um hospedeiro particular, pode ser selecionada uma sequência codificante a qual reflete a tendência de uso de códons do hospedeiro. A título de exemplo, um peptídeo TraP10 pode ser codificado pela sequência de nucleotídeos estipulada como SEQ ID NO: 9.

[00138] Em exemplos particulares, um peptídeo TraP11 é igual a ou tem menos de 68 aminoácidos de comprimento. Por exemplo, um peptídeo TraP11 pode ter 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, ou menos aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP11 compreende a sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 2, ou uma variante funcional da mesma. Deste modo, um peptídeo TraP11 pode compreender uma sequência de aminoácidos compreendendo a SEQ ID NO: 2, ou uma variante funcional da mesma, em que o comprimento do peptídeo TraP11 ou variante funcional do mesmo é igual a ou tem menos de 68 aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP11 ou variante funcional do mesmo pode compreender uma sequência de aminoácidos que é, por exemplo, no mínimo 80%, no mínimo 85%, no mínimo 90%, no mínimo 92%, no mínimo 94%, no mínimo 95%, no mínimo 96%, no mínimo 97%, no mínimo 98%, no mínimo 99%, ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 2.

[00139] Todas as sequências de nucleotídeos que codificam, por exemplo, o peptídeo TraP11 de SEQ ID NO: 2, ou variantes funcionais das mesmas compreendendo menos do que a sequência inteira de

SEQ ID NO: 2, vão ser imediatamente reconhecíveis por aqueles versados na técnica. A degeneração do código genético proporciona um número finito de sequências de codificação para uma sequência de aminoácidos em particular. A seleção de uma sequência em particular para codificar um peptídeo TraP11 está dentro do critério do profissional. Diferentes sequências de codificação podem ser desejáveis em diferentes aplicações. Por exemplo, de modo a aumentar a expressão do peptídeo TraP11 em um hospedeiro particular, pode ser selecionada uma sequência codificante a qual reflete a tendência de uso de códons do hospedeiro. A título de exemplo, um peptídeo TraP11 pode ser codificado pela sequência de nucleotídeos estipulada como SEQ ID NO: 10.

[00140] Em exemplos particulares, um peptídeo TraP17 é igual a ou tem menos de 66 aminoácidos de comprimento. Por exemplo, um peptídeo TraP17 pode ter 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58 ou menos aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP17 compreende a sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 3, ou uma variante funcional da mesma. Deste modo, um peptídeo TraP17 pode compreender uma sequência de aminoácidos compreendendo a SEQ ID NO: 3, ou uma variante funcional da mesma, em que o comprimento do peptídeo TraP17 ou variante funcional do mesmo é igual a ou tem menos de 66 aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP17 ou variante funcional do mesmo pode compreender uma sequência de aminoácidos que é, por exemplo, no mínimo 80%, no mínimo 85%, no mínimo 90%, no mínimo 92%, no mínimo 94%, no mínimo 95%, no mínimo 96%, no mínimo 97%, no mínimo 98%, no mínimo 99%, ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 3.

[00141] Todas as sequências de nucleotídeos que codificam, por exemplo, o peptídeo TraP17 de SEQ ID NO: 3, ou variantes funcionais

das mesmas compreendendo menos do que a sequência inteira de SEQ ID NO: 3, vão ser imediatamente reconhecíveis por aqueles versados na técnica. A degeneração do código genético proporciona um número finito de sequências de codificação para uma sequência de aminoácidos em particular. A seleção de uma sequência em particular para codificar um peptídeo TraP17 está dentro do critério do profissional. Diferentes sequências de codificação podem ser desejáveis em diferentes aplicações. Por exemplo, de modo a aumentar a expressão do peptídeo TraP17 em um hospedeiro particular, pode ser selecionada uma sequência codificante a qual reflete a tendência de uso de códons do hospedeiro. A título de exemplo, um peptídeo TraP17 pode ser codificado pela sequência de nucleotídeos estipulada como SEQ ID NO: 11.

[00142] Em exemplos particulares, um peptídeo TraP18 é igual a ou tem menos de 67 aminoácidos de comprimento. Por exemplo, um peptídeo TraP18 pode ter 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, ou menos aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP18 compreende a sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 4, ou uma variante funcional da mesma. Deste modo, um peptídeo TraP18 pode compreender uma sequência de aminoácidos compreendendo a SEQ ID NO: 4, ou uma variante funcional da mesma, em que o comprimento do peptídeo TraP18 ou variante funcional do mesmo é igual a ou tem menos de 67 aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP18 ou variante funcional do mesmo pode compreender uma sequência de aminoácidos que é, por exemplo, no mínimo 80%, no mínimo 85%, no mínimo 90%, no mínimo 92%, no mínimo 94%, no mínimo 95%, no mínimo 96%, no mínimo 97%, no mínimo 98%, no mínimo 99%, ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 4.

[00143] Todas as sequências de nucleotídeos que codificam, por

exemplo, o peptídeo TraP18 de SEQ ID NO: 4, ou variantes funcionais das mesmas compreendendo menos do que a sequência inteira de SEQ ID NO: 4, vão ser imediatamente reconhecíveis por aqueles versados na técnica. A degeneração do código genético proporciona um número finito de sequências de codificação para uma sequência de aminoácidos em particular. A seleção de uma sequência em particular para codificar um peptídeo TraP18 está dentro do critério do profissional. Diferentes sequências de codificação podem ser desejáveis em diferentes aplicações. Por exemplo, de modo a aumentar a expressão do peptídeo TraP18 em um hospedeiro particular, pode ser selecionada uma sequência codificante a qual reflete a tendência de uso de códons do hospedeiro. A título de exemplo, um peptídeo TraP18 pode ser codificado pela sequência de nucleotídeos estipulada como SEQ ID NO: 12.

[00144] Em exemplos particulares, um peptídeo TraP19 é igual a ou tem menos de 67 aminoácidos de comprimento. Por exemplo, um peptídeo TraP19 pode ter 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, ou menos aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP19 compreende a sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 5, ou uma variante funcional da mesma. Deste modo, um peptídeo TraP19 pode compreender uma sequência de aminoácidos compreendendo a SEQ ID NO: 5, ou uma variante funcional da mesma, em que o comprimento do peptídeo TraP19 ou variante funcional do mesmo é igual a ou tem menos de 67 aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP19 ou variante funcional do mesmo pode compreender uma sequência de aminoácidos que é, por exemplo, no mínimo 80%, no mínimo 85%, no mínimo 90%, no mínimo 92%, no mínimo 94%, no mínimo 95%, no mínimo 96%, no mínimo 97%, no mínimo 98%, no mínimo 99%, ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 5.

[00145] Todas as sequências de nucleotídeos que codificam, por exemplo, o peptídeo TraP19 de SEQ ID NO: 5, ou variantes funcionais das mesmas compreendendo menos do que a sequência inteira de SEQ ID NO: 5, vão ser imediatamente reconhecíveis por aqueles versados na técnica. A degeneração do código genético proporciona um número finito de sequências de codificação para uma sequência de aminoácidos em particular. A seleção de uma sequência em particular para codificar um peptídeo TraP19 está dentro do critério do profissional. Diferentes sequências de codificação podem ser desejáveis em diferentes aplicações. Por exemplo, de modo a aumentar a expressão do peptídeo TraP19 em um hospedeiro particular, pode ser selecionada uma sequência codificante a qual reflete a tendência de uso de códons do hospedeiro. A título de exemplo, um peptídeo TraP19 pode ser codificado pela sequência de nucleotídeos estipulada como SEQ ID NO: 13.

[00146] Em exemplos particulares, um peptídeo TraP26 é igual a ou tem menos de 60 aminoácidos de comprimento. Por exemplo, um peptídeo TraP26 pode ter 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, ou menos aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP26 compreende a sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 6, ou uma variante funcional da mesma. Deste modo, um peptídeo TraP26 pode compreender uma sequência de aminoácidos compreendendo a SEQ ID NO: 6, ou uma variante funcional da mesma, em que o comprimento do peptídeo TraP26 ou variante funcional do mesmo é igual a ou tem menos de 60 aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP26 ou variante funcional do mesmo pode compreender uma sequência de aminoácidos que é, por exemplo, no mínimo 80%, no mínimo 85%, no mínimo 90%, no mínimo 92%, no mínimo 94%, no mínimo 95%, no mínimo 96%, no mínimo 97%, no mínimo 98%, no mínimo 99%, ou 100% idêntica à

SEQ ID NO: 6.

[00147] Todas as sequências de nucleotídeos que codificam, por exemplo, o peptídeo TraP26 de SEQ ID NO: 6, ou variantes funcionais das mesmas compreendendo menos do que a sequência inteira de SEQ ID NO: 6, vão ser imediatamente reconhecíveis por aqueles versados na técnica. A degeneração do código genético proporciona um número finito de sequências de codificação para uma sequência de aminoácidos em particular. A seleção de uma sequência em particular para codificar um peptídeo TraP26 está dentro do critério do profissional. Diferentes sequências de codificação podem ser desejáveis em diferentes aplicações. Por exemplo, de modo a aumentar a expressão do peptídeo TraP26 em um hospedeiro particular, pode ser selecionada uma sequência codificante a qual reflete a tendência de uso de códons do hospedeiro. A título de exemplo, um peptídeo TraP26 pode ser codificado pela sequência de nucleotídeos estipulada como SEQ ID NO: 14.

[00148] Em exemplos particulares, um peptídeo TraP27 é igual a ou tem menos de 61 aminoácidos de comprimento. Por exemplo, um peptídeo TraP27 pode ter 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, ou menos aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP27 compreende a sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 7, ou uma variante funcional da mesma. Deste modo, um peptídeo TraP27 pode compreender uma sequência de aminoácidos compreendendo a SEQ ID NO: 7, ou uma variante funcional da mesma, em que o comprimento do peptídeo TraP27 ou variante funcional do mesmo é igual a ou tem menos de 61 aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP27 ou variante funcional do mesmo pode compreender uma sequência de aminoácidos que é, por exemplo, no mínimo 80%, no mínimo 85%, no mínimo 90%, no mínimo 92%, no mínimo 94%, no mínimo 95%, no mínimo 96%, no

mínimo 97%, no mínimo 98%, no mínimo 99%, ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 7.

[00149] Todas as sequências de nucleotídeos que codificam, por exemplo, o peptídeo TraP27 de SEQ ID NO: 7, ou variantes funcionais das mesmas compreendendo menos do que a sequência inteira de SEQ ID NO: 7, vão ser imediatamente reconhecíveis por aqueles versados na técnica. A degeneração do código genético proporciona um número finito de sequências de codificação para uma sequência de aminoácidos em particular. A seleção de uma sequência em particular para codificar um peptídeo TraP27 está dentro do critério do profissional. Diferentes sequências de codificação podem ser desejáveis em diferentes aplicações. Por exemplo, de modo a aumentar a expressão do peptídeo TraP27 em um hospedeiro particular, pode ser selecionada uma sequência codificante a qual reflete a tendência de uso de códons do hospedeiro. A título de exemplo, um peptídeo TraP27 pode ser codificado pela sequência de nucleotídeos estipulada como SEQ ID NO: 15.

[00150] Em exemplos particulares, um peptídeo TraP28 é igual a ou tem menos de 60 aminoácidos de comprimento. Por exemplo, um peptídeo TraP28 pode ter 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, ou menos aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP28 compreende a sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 8, ou uma variante funcional da mesma. Deste modo, um peptídeo TraP28 pode compreender uma sequência de aminoácidos compreendendo a SEQ ID NO: 8, ou uma variante funcional da mesma, em que o comprimento do peptídeo TraP28 ou variante funcional do mesmo é igual a ou tem menos de 60 aminoácidos de comprimento. Em determinados exemplos, um peptídeo TraP28 ou variante funcional do mesmo pode compreender uma sequência de aminoácidos que é, por exemplo, no mínimo 80%, no mínimo 85%, no mínimo 90%,

no mínimo 92%, no mínimo 94%, no mínimo 95%, no mínimo 96%, no mínimo 97%, no mínimo 98%, no mínimo 99%, ou 100% idêntica à SEQ ID NO: 8.

[00151] Todas as sequências de nucleotídeos que codificam, por exemplo, o peptídeo TraP28 de SEQ ID NO: 8, ou variantes funcionais das mesmas compreendendo menos do que a sequência inteira de SEQ ID NO: 8, vão ser imediatamente reconhecíveis por aqueles versados na técnica. A degeneração do código genético proporciona um número finito de sequências de codificação para uma sequência de aminoácidos em particular. A seleção de uma sequência em particular para codificar um peptídeo TraP28 está dentro do critério do profissional. Diferentes sequências de codificação podem ser desejáveis em diferentes aplicações. Por exemplo, de modo a aumentar a expressão do peptídeo TraP28 em um hospedeiro particular, pode ser selecionada uma sequência codificante a qual reflete a tendência de uso de códons do hospedeiro. A título de exemplo, um peptídeo TraP28 pode ser codificado pela sequência de nucleotídeos estipulada como SEQ ID NO: 16.

[00152] Qualquer polipeptídeo pode ser direcionado para um plastídeo de uma célula contendo plastídeo por incorporação de uma sequência de peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28. Por exemplo, um polipeptídeo pode ser ligado a uma sequência de peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 em algumas modalidades, de modo a direcionar o polipeptídeo para um plastídeo em uma célula em que a molécula de polipeptídeo-TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 ligada é expressada. Em modalidades particulares, um polipeptídeo direcionado para um plastídeo por incorporação de uma sequência de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser, por exemplo, um poli-

peptídeo que é expressado normalmente em um plastídeo de uma célula em que o polipeptídeo é expressado nativamente. Por exemplo e sem limitação, um polipeptídeo direcionado para um plastídeo por incorporação de uma sequência de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser um polipeptídeo envolvido em resistência a herbicidas, resistência a vírus, resistência a patógenos bacterianos, resistência a insetos, resistência a nematódeos, ou resistência a fungos. Vide, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos.: 5.569.823; 5.304.730; 5.495.071; 6.329.504; e 6.337.431. Um polipeptídeo direcionado para um plastídeo por incorporação de uma sequência de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser alternativamente, por exemplo e sem limitação, um polipeptídeo envolvido no vigor ou na produtividade da planta (incluindo polipeptídeos envolvidos em tolerância a temperaturas extremas, às condições do solo, aos níveis de luminosidade, aos níveis de água, aos níveis de nitrogênio, e ao meio ambiente químico), ou um polipeptídeo que pode ser usado como um marcador para identificar uma planta compreendendo um traço de interesse (por exemplo, um produto genético marcador selecionável, um polipeptídeo envolvido em cor das sementes, etc.).

[00153] Exemplos não limitantes de polipeptídeos envolvidos em resistência a herbicidas que podem ser ligados a uma sequência de peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 em algumas modalidades da invenção incluem: acetolactase sintase (ALS), acetolactase sintase mutada, e precursores da acetolactase sintase (vide, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos No. 5.013.659); EPSPS (vide, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 4.971.908 e 6.225.114), tal como em algumas modalidades uma DGT-28 ou uma EPSPS classe IV, ou em outras modalidades uma CP4 EPSPS ou uma EPSPS classe III; enzimas que modificam

um processo fisiológico que ocorre em um plastídeo, incluindo fotosíntese, e síntese de ácidos graxos, aminoácidos, óleos, arotenoides, terpenoides, amido, etc. Outros exemplos não limitantes de polipeptídeos que podem ser ligados a um peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 em modalidades particulares incluem: zeaxantina epoxidase, colina monooxygenase, ferroquelatase, ácido graxo ômega-3 dessaturase, glutamina sintetase, enzimas de modificação de amido, polipeptídeos envolvidos em síntese de aminoácidos essenciais, provitamina A, hormônios, proteínas toxinas do Bt, etc. Sequências de nucleotídeos codificando os peptídeos supracitados estão disponíveis na técnica, e as sequências de nucleotídeos referidas podem ser ligadas operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 para ser expressada em um polipeptídeo compreendendo o polipeptídeo de interesse ligado ao peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28. Além do mais, sequências de nucleotídeos adicionais codificando qualquer um dos polipeptídeos supracitados podem ser identificadas por aqueles versados na técnica (por exemplo, por clonagem de genes com alta homologia a outros genes codificando o polipeptídeo particular). Assim que uma sequência de nucleotídeos semelhante foi identificada, pode ser projetada uma segunda sequência de nucleotídeos compreendendo uma sequência codificante de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 ligada operacionalmente à sequência de nucleotídeos identificada, ou uma sequência codificando um polipeptídeo equivalente.

V. Expressão de polipeptídeos compreendendo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28

[00154] Em algumas modalidades, no mínimo uma ou mais moléculas

las de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser introduzida em uma célula, em um tecido, ou em um organismo para expressão do polipeptídeo no mesmo. Em modalidades particulares, uma molécula de ácido nucleico pode compreender uma sequência de nucleotídeos de interesse ligado operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico pode compreender uma sequência codificante codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 e no mínimo uma sequência de peptídeo adicional codificada por uma sequência de nucleotídeos de interesse. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico da invenção pode ser introduzida em um célula hospedeira contendo plastídeo, em um tecido hospedeira contendo plastídeo, ou em um organismo hospedeira contendo plastídeo (por exemplo, uma célula de planta, um tecido de planta, e uma planta), de tal modo que um polipeptídeo pode ser expressado a partir da molécula de ácido nucleico na célula hospedeira contendo plastídeo, no tecido hospedeira contendo plastídeo, ou no organismo hospedeiro contendo plastídeo, em que o polipeptídeo expressado compreende no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 e no mínimo uma sequência de peptídeo adicional codificada por uma sequência de nucleotídeos de interesse. Em determinados exemplos, o peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 de um polipeptídeo expressado semelhante pode facilitar o direcionamento

de uma porção do polipeptídeo compreendendo no mínimo a sequência de peptídeo adicional para um plastídeo da célula hospedeira, do tecido hospedeiro, ou do organismo hospedeiro.

[00155] Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico da invenção pode ser introduzida em uma célula contendo plastídeo por uma de quaisquer das metodologias de conhecimento geral daqueles versados na técnica. Em modalidades particulares, uma célula hospedeira, um tecido hospedeiro, ou um organismo hospedeiro pode ser posto em contato com uma molécula de ácido nucleico da invenção de modo a introduzir a molécula de ácido nucleico dentro da célula, do tecido, ou do organismo. Em modalidades particulares, uma célula pode ser transformada com uma molécula de ácido nucleico da invenção de tal modo que a molécula de ácido nucleico seja introduzida dentro da célula, e a molécula de ácido nucleico seja integrada de modo estável no genoma da célula. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico que compreende no mínimo uma sequência de nucleotídeos codificando um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 ligada operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos de interesse pode ser usada para transformação de uma célula, por exemplo, uma célula contendo plastídeo (por exemplo, uma célula de planta). De modo a iniciar ou reforçar a expressão, uma molécula de ácido nucleico pode compreender uma ou mais sequências reguladoras, cujas sequências reguladoras podem ser ligadas operacionalmente à sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28.

[00156] Uma molécula de ácido nucleico pode ser, por exemplo, um sistema vetorial incluindo, por exemplo, um plasmídeo linear ou um plasmídeo circular fechado. Em modalidades particulares, o vetor pode

ser um vetor de expressão. Sequências de ácido nucleico da invenção podem ser, por exemplo, inseridas em um vetor, de tal modo que a sequência de ácido nucleico seja ligada operacionalmente a uma ou mais sequências reguladoras. Muitos vetores estão disponíveis para este fim, e a seleção do vetor em particular pode depender, por exemplo, do tamanho do ácido nucleico a ser inserido no vetor e da célula hospedeira em particular a ser transformada com o vetor. Um vetor tipicamente contém vários componentes, cuja identidade depende de uma função do vetor (por exemplo, amplificação de DNA e expressão de DNA), e da uma ou mais células hospedeiras em particular com as quais o vetor é compatível.

[00157] Algumas modalidades podem incluir um vetor de transformação de planta que compreende uma sequência de nucleotídeos compreendendo no mínimo uma das sequências reguladoras descritas acima ligada operacionalmente a uma ou mais sequências de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28. A uma ou mais sequências de nucleotídeos podem ser expressadas, sob o controle da uma ou mais sequências reguladoras, em uma célula de planta, de um tecido, ou de um organismo para produzir um polipeptídeo compreendendo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 que direciona no mínimo uma porção do polipeptídeo para um plastídeo da célula de planta, do tecido, ou do organismo.

[00158] Em algumas modalidades, uma sequência reguladora ligada operacionalmente a uma sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28, pode ser uma sequência de promotor que funcio-

na em uma célula hospedeira, tal como uma célula bacteriana em que a molécula de ácido nucleico deve ser amplificada, ou uma célula de planta em que a molécula de ácido nucleico deve ser expressada. Promotores adequados para uso em moléculas de ácido nucleico da invenção incluem os que são indutíveis, virais, sintéticos, ou constitutivos, todos os quais são de conhecimento geral na técnica. Exemplos não limitantes de promotores que podem ser úteis em modalidades da invenção são proporcionados pelas: Patentes dos Estados Unidos Nos. 6.437.217 (promotor RS81 do milho); 5.641.876 (promotor de actina do arroz); 6.426.446 (promotor RS324 do milho); 6.429.362 (promotor PR-1 do milho); 6.232.526 (promotor A3 do milho); 6.177.611 (promotores do milho constitutivos); 5.322.938, 5.352.605, 5.359.142, e 5.530.196 (promotor 35S); 6.433.252 (promotor de L3 oleosina do milho); 6.429.357 (promotor de actina 2 do arroz, e íntron de actina 2 do arroz); 6.294.714 (promotores indutíveis pela luz); 6.140.078 (promotores indutíveis por sais); 6.252.138 (promotores indutíveis por patógenos); 6,175,060 (promotores indutíveis por deficiência de fósforo); 6.388.170 (promotores bidirecionais); 6.635.806 (promotor de gama-coixina); e Pedido de Patente dos Estados Unidos Serial No. 09/757.089 (promotor da aldolase de cloroplastos do milho).

[00159] Exemplos adicionais de promotores incluem o promotor da nopalina sintase (NOS) (Ebert *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(16):5745-9); o promotor da octopina sintase (OCS) (o qual é carregado sobre plasmídeos de indução tumoral de *Agrobacterium tumefaciens*); os promotores do caulimovírus tais como o promotor 19S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Lawton *et al.* (1987), *Plant Mol. Biol.* 9:315-24); o promotor 35S do CaMV (Odell *et al.* (1985), *Nature* 313:810-2); o promotor 35S do vírus do mosaico da escrofulária (Walker *et al.* (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(19):6624-8); o promotor da sacarose sintase (Yang and Russell (1990), *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 87:4144-8); o promotor do complexo genético R (Chandler *et al.* (1989), *Plant Cell* 1:1175-83); o promotor do gene da proteína de ligação de clorofila a/b; CaMV35S (Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.322.938, 5.352.605, 5.359.142, e 5.530.196); FMV35S (Patentes dos Estados Unidos Nos. 6.051.753, e 5.378.619); um promotor PC1SV (Patente dos Estados Unidos No. 5.850.019); o promotor SCP1 (Patente dos Estados Unidos No. 6.677.503); e os promotores AGRtu.nos (GenBank Acesso No. V00087; Depicker *et al.* (1982), *J. Mol. Appl. Genet.* 1:561-73; Bevan *et al.* (1983), *Nature* 304:184-7).

[00160] Em modalidades particulares, moléculas de ácido nucleico da invenção podem compreender um promotor tecido-específico. Um promotor tecido-específico é uma sequência de nucleotídeos que direciona um maior nível de transcrição de uma sequência de nucleotídeos ligada operacionalmente no tecido para o qual o promotor é específico, em relação aos outros tecidos do organismo. Exemplos de promotores tecido-específicos incluem, sem limitação: promotores *tapetum*-específicos; promotores de antera específicos; promotores de pólen específicos (vide, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos No. No. 7.141.424, e a Publicação do Pedido de Patente Internacional No. WO 99/042587); promotores de óvulo específicos; (vide, por exemplo, o Pedido de Patente dos Estados Unidos No. 2001/047525 A1); promotores de fruto específicos (vide, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos No. Nos. 4.943.674, e 5.753.475); e promotores de semente específicos (vide, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.420.034, e 5.608.152). Em algumas modalidades, um promotor de estágio de desenvolvimento específico (por exemplo, um promotor ativo em um estágio de desenvolvimento posterior) pode ser usado em uma composição ou em um método da invenção.

[00161] Sequências reguladoras adicionais que em algumas modalidades podem ser ligadas operacionalmente a uma molécula de ácido

nucleico incluem 5' UTRs localizadas entre uma promotor sequência e uma sequência codificante que funcionam como uma sequência líder de translação. A sequência líder de translação está presente no mRNA totalmente processado, e pode afetar o processamento do transcripto primário, e/ou estabilidade de RNA. Exemplos de sequências líderes de translação incluem líderes do choque térmico do milho e da petúnia (Patente dos Estados Unidos No. 5.362.865), líderes de proteínas do revestimento do vírus da planta, líderes do rubisco da planta, e outras. Vide, por exemplo, Turner and Foster (1995), *Molecular Biotech.* 3(3):225-36. Exemplos não limitantes de 5' UTRs são proporcionados por: GmHsp (Patente dos Estados Unidos No. 5.659.122); PhDnaK (Patente dos Estados Unidos No. 5.362.865); AtAnt1; TEV (Carrington and Freed (1990), *J. Virol.* 64:1590-7); e AGRtunos (GenBank Acesso No. V00087; e Bevan *et al.* (1983), *Nature* 304:184-7).

[00162] Sequências reguladoras adicionais que em algumas modalidades podem ser ligadas operacionalmente a uma molécula de ácido nucleico também incluem sequências não traduzidas 3', regiões de terminação de transcrição 3', ou regiões de poli-adenilação. Estas são elementos genéticos localizados a jusante de uma sequência de nucleotídeos, e incluem polinucleotídeos que proporcionam sinal de poli-adenilação, e/ou outros sinais reguladores capazes de afetar a transcrição ou o processamento de mRNA. O sinal de poliadenilação funciona em plantas causando a adição de nucleotídeos poliadenilados à extremidade 3' do precursor de mRNA. A sequência de poliadenilação pode ser derivada a partir de uma variedade de genes de plantas, ou a partir de genes de T-DNA. Um exemplo não limitante de uma região de terminação de transcrição 3' é a região 3' de nopalina sintase (nos 3'; Fraley *et al.* (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7). Um exemplo do uso de diferentes regiões não traduzidas 3' é proporcionado em Ingelbrecht *et al.*, (1989), *Plant Cell* 1:671-80. Exemplos não limitantes

de sinais de poliadenilação incluem um entre um gene RbcS2 de *Pisum sativum* (Ps.RbcS2-E9; Coruzzi *et al.* (1984), *EMBO J.* 3:1671-9) e AGRtu.nos (GenBank Acesso No. E01312).

[00163] Uma molécula de ácido nucleico recombinante ou vetor da presente invenção pode compreender um marcador selecionável que confere um fenótipo selecionável sobre uma célula transformada, tal como uma célula de planta. Marcadores selecionáveis também podem ser usados para selecionar plantas ou células de plantas que compreendem a molécula de ácido nucleico recombinante da invenção. O marcador pode codificar para resistência a biocidas, resistência a antibióticos (por exemplo, kanamicin, Geneticin (G418), bleomicina, higromicina, etc.), ou resistência a herbicidas (por exemplo, glifosato, etc.). Exemplos de marcadores selecionáveis incluem, mas não estão limitados a: um gene *neo* o qual codifica para resistência a canamicina e pode ser selecionado para o uso de canamicina, G418, etc.; um gene *bar* o qual codifica para resistência a bialaphos; um gene de EPSP sintase mutante o qual codifica para resistência a glifosato; um gene de nitrilase o qual confere resistência a bromoxinil; um gene de acetolactato sintase mutante (*ALS*) o qual confere resistência a imidazolinona ou a sulfonilureia; e um gene DHFR resistente a metotrexato. Estão disponíveis múltiplos marcadores selecionáveis que conferem resistência a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, canamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina, espectinomomicina, rifampicina, estreptomicina e tetraciclina, e semelhantes. Exemplos de semelhantes marcadores selecionáveis são ilustrados, por exemplo, nas Patentes dos Estados Unidos Nos.: 5.550.318; 5.633.435; 5.780.708 e 6.118.047.

[00164] Uma molécula de ácido nucleico recombinante ou vetor da presente invenção pode também ou alternativamente incluir um marcador triável. Marcadores triáveis podem ser usados para monitorar a

expressão. Exemplos de marcadores triáveis incluem um gene de β -glucuronidase ou *uidA* (GUS) o qual codifica uma enzima para a qual são conhecidos vários substratos cromogênicos (Jefferson *et al.* (1987), *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405); um gene do locus R, o qual codifica um produto que regula a produção de pigmentos de antocianina (cor vermelha) em tecidos de plantas (Dellaporta *et al.* (1988) "Molecular cloning of the maize *R-nj* allele by transposon tagging with *Ac*." In 18th *Stadler Genetics Symposium*, P. Gustafson and R. Appels, eds. (New York: Plenum), pp. 263-82); um gene da β -lactamase (Sutcliffe *et al.* (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-41); um gene o qual codifica uma enzima para a qual são conhecidos vários substratos cromogênicos (por exemplo, PADAC, uma cefalosporina cromogênica); um gene de luciferase (Ow *et al.* (1986), *Science* 234:856-9); um gene *xylE* que codifica uma catecol dioxigenase que pode converter catecóis cromogênicos (Zukowski *et al.* (1983), *Gene* 46(2-3):247-55); um gene de amilase (Ikatu *et al.* (1990), *Bio/Technol.* 8:241-2); um gene de tirosinase o qual codifica uma enzima capaz de oxidar tirosina para DOPA e dopaquinona a qual por sua vez condensa para melânica (Katz *et al.* (1983), *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-14); e uma α -galactosidase.

[00165] Métodos adequados para transformação de células hospedeiras incluem qualquer método pelo qual DNA pode ser introduzido em uma célula, por exemplo e sem limitação: por transformação de protoplastos (vide, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos No. 5.508.184); por captação DNA mediada por dessecação/inibição (vide, por exemplo, Potrykus *et al.* (1985), *Mol. Gen. Genet.* 199:183-8); por eletroporação (vide, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos No. 5.384.253); por agitação com fibras de carboneto de silício (vide, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.302.523 e 5.464.765); por transformação mediada por *Agrobacterium* (vide, por

exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.563.055, 5.591.616, 5.693.512, 5.824.877, 5.981.840, e 6.384.301); e por aceleração de partículas revestidas com DNA (vide, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.015.580, 5.550.318, 5.538.880, 6.160.208, 6.399.861, e 6.403.865); etc. Através da aplicação de técnicas tais como estas, as células de virtualmente quaisquer espécies podem ser transformadas de modo estável. Em algumas modalidades, a transformação do DNA é integrada no genoma da célula hospedeira. No caso de espécies multicelulares, células transgênicas podem ser regeneradas em um organismo transgênico. Qualquer uma destas técnicas pode ser usada para produzir uma planta transgênica, por exemplo, compreendendo uma ou sequências de ácido nucleico da invenção no genoma da planta transgênica.

[00166] O método mais amplamente utilizado para a introdução de um vetor de expressão em plantas se baseia no sistema de transformação natural de *Agrobacterium*. *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* são bactérias do solo patogênicas para as plantas as quais transformam geneticamente células de plantas. Os plasmídeos Ti e Ri de *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, respectivamente, carregam genes responsáveis por transformação genética da planta. Os plasmídeos Ti (de indução tumoral) contêm um grande segmento, conhecido como T-DNA, o qual é transferido para plantas transformadas. Outro segmento do plasmídeo Ti, a região vir, é responsável por transferência de T-DNA. A região do T-DNA é delimitada por repetições de terminais. Em alguns vetores binários modificados, os genes de indução tumoral foram eliminados, e as funções da região vir são utilizadas para transferir DNA estranho delimitado pelas sequências de limite de T-DNA. A região T também pode conter, por exemplo, um marcador selecionável para recuperação eficaz de células e plantas transgênicas, e um sítio de múltipla clonagem para inserção de sequências para transferência

tais como um ácido nucleico codificando TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28.

[00167] Deste modo, em algumas modalidades, um vetor de transformação de planta é derivado a partir de um plasmídeo Ti de *A. tumefaciens* (vide, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 4.536.475, 4.693.977, 4.886.937, e 5.501.967; e a Patente Europeia No. EP 0 122 791) ou um plasmídeo Ri de *A. rhizogenes*. Vetores de transformação de planta adicionais incluem, por exemplo e sem limitação, os descritos por Herrera-Estrella *et al.* (1983), *Nature* 303:209-13; Bevan *et al.* (1983), *Nature* 304:184-7; Klee *et al.* (1985), *Bio/Technol.* 3:637-42; e na Patente Europeia No. EP 0 120 516, e os derivados a partir de qualquer um dos precedentes. Outras bactérias tais como *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, e *Mesorhizobium* que interagem com plantas naturalmente podem ser modificadas para mediar a transferência genética para uma série de plantas diversas. Estas bactérias simbióticas associadas com planta podem ser tornadas competentes para transferência genética por aquisição tanto de um plasmídeo Ti desarmado quanto de um vetor binário adequado.

[00168] Depois de proporcionar DNA exógeno para células receptoras, células transformadas são geralmente identificadas para cultura posterior e regeneração da planta. De modo a melhorar a capacidade de identificar células transformadas, pode-se desejar empregar um gene marcador selecionável ou triável, conforme previamente estipulado, com o vetor usado para gerar o transformante. No caso em que é usado um marcador selecionável, as células transformadas são identificadas dentro da população celular potencialmente transformada expondo as células a um agente ou agentes seletivos. No caso em que é usado um marcador triável, as células podem ser triadas para o traço do gene marcador desejado.

[00169] Células que sobrevivem à exposição ao agente seletivo, ou

células que tenham sido marcadas como positivas em um ensaio de triagem, podem ser cultivadas em meio que suporta a regeneração de plantas. Em algumas modalidades, qualquer meio de cultura de tecido de planta adequado (por exemplo, meios MS e N6) pode ser modificado incluindo substâncias adicionais, tais como reguladores do crescimento. O tecido pode ser mantido sobre um meio básico com reguladores do crescimento até estar disponível tecido suficiente para iniciar os esforços de regeneração da planta, ou depois de rodadas repetidas de seleção manual, até a morfologia do tecido ser adequada para regeneração (por exemplo, no mínimo 2 semanas), e em seguida transferido para meio favorável para a formação de vergôntes. As culturas são transferidas periodicamente até ter ocorrido suficiente formação de vergôntes. Assim que as vergôntes são formadas, são transferidas para meio favorável para a formação de raízes. Assim que raízes suficientes são formadas, as plantas podem ser transferidas para o solo para crescimento adicional e maturidade.

[00170] De modo a confirmar a presença de uma molécula de ácido nucleico de interesse (por exemplo, uma sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28) em uma planta em regeneração, podem ser realizados uma variedade de ensaios. Os ensaios referidos incluem, por exemplo: ensaios de biologia molecular, tais como Southern e Northern blotting, PCR, e sequenciamento de ácido nucleico; ensaios bioquímicos, tais como detecção da presença de um produto de proteína, por exemplo, por meios imunológicos (ELISA e/ou Western blots) ou por função enzimática; ensaios de partes de plantas, tais como ensaios de folhas ou de raízes; e análise do fenótipo da planta regenerada inteira.

[00171] Eventos de integração podem ser analisados, por exemplo,

por amplificação por PCR usando, por exemplo, iniciadores de oligonucleotídeos específicos para uma sequência de nucleotídeos de interesse. Genotipagem por PCR é entendida como incluindo, mas não estando limitada a, reação de cadeia polimerase (PCR) amplificação de DNA genômico derivado a partir de tecido de planta hospedeira isolado previsto para conter uma molécula de ácido nucleico de interesse integrada no genoma, seguida por clonagem de rotina e análise de sequência de produtos de amplificação por PCR. Métodos de genotipagem por PCR foram descritos de modo geral (vide, por exemplo, Rios, G. *et al.* (2002), *Plant J.* 32:243-53) e podem ser aplicados a DNA genômico derivado a partir de quaisquer espécies de plantas (por exemplo, *Z. mays* ou *G. max*) ou tipo de tecido, incluindo culturas celulares.

[00172] Uma planta transgênica formada usando métodos de transformação dependentes de *Agrobacterium* tipicamente contém uma única sequência de DNA recombinante inserida dentro de um cromossoma. A única sequência de DNA recombinante é referida como um "evento transgênico" ou "evento de integração." As plantas transgênicas referidas o mais provavelmente são heterozigotos para a sequência de DNA inserida. Em algumas modalidades, uma planta transgênica heterozigoto com respeito a um transgene pode ser obtida por acasalamento sexual (autopolinização) de uma planta transgênica segregante independente que contém uma única sequência genética exógena consigo mesma, por exemplo, uma planta T₀, para produzir sementes T₁. Um quarto das sementes T₁ produzidas será homozigoto com respeito ao transgene. A germinação de sementes T₁ resulta em plantas que podem ser testadas para heterozigosidade, tipicamente usando um ensaio de SNP ou um ensaio de amplificação à base de PCR que permite a distinção entre heterozigotos e homozigotos (isto é, um ensaio de zigosidade).

[00173] Em modalidades particulares, cópias de no mínimo um po-

lipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de clo-roplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 são produzidas em uma célula contendo plastídeo, dentro da qual tenha sido introduzida no mínimo uma ou mais moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos codifi-cando o no mínimo um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28. Cada polipeptídeo compreen-dendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser expressado a partir de múltiplas sequências de ácido nucleico in-troduzidas em diferentes eventos de transformação, ou a partir de uma única sequência de ácido nucleico introduzida em um único evento de transformação. Em algumas modalidades, uma pluralidade de seme-lhantes polipeptídeos é expressada sob o controle de um único promo-tor. Em outras modalidades, uma pluralidade de semelhantes polipep-tídeos é expressada sob o controle de múltiplos promotores. Podem ser expressados polipeptídeos únicos que compreendem múltiplas se-quências de peptídeos, das quais cada uma sequências de peptídeos deve ser direcionada para um plastídeo.

[00174] Além de direcionar a transformação de uma planta com uma molécula de ácido nucleico recombinante, as plantas transgêni-cas podem ser preparadas cruzando uma primeira planta que tem no mínimo um evento transgênico com uma segunda planta que não ca-rece de um evento semelhante. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico recombinante compreendendo uma sequência de nucleotí-deos codificando um polipeptídeo que compreende no mínimo um pep-tídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser introduzida em uma primeira linhagem de planta que é suscetível a transformação, para

produzir uma planta transgênica, cuja planta transgênica pode ser cruzada com uma segunda linhagem de planta para introgressão da sequência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo para dentro da segunda linhagem de planta.

VI. Materiais de plantas compreendendo um polipeptídeo direcionado para peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28

[00175] Em algumas modalidades, é proporcionada uma planta, em que a planta compreende uma célula de planta compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28. Em modalidades particulares, uma planta semelhante pode ser produzida por transformação de um tecido de planta ou de uma célula de planta, e regeneração de uma planta inteira. Em modalidades adicionais, uma planta semelhante pode ser obtida a partir de uma fonte comercial, ou através de introgressão de um ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 em um germaplasma. Também são proporcionados materiais de plantas compreendendo uma célula de planta compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28. Um material de planta semelhante pode ser obtido a partir de uma planta compreendendo a célula de planta. Em modalidades adicionais, o material de planta é uma célula de planta que é incapaz de regeneração para produzir uma planta.

[00176] Uma planta transgênica ou um material de planta compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo

compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 em algumas modalidades pode apresentar uma ou mais das seguintes características: expressão do polipeptídeo em uma célula da planta; expressão de uma porção do polipeptídeo em um plastídeo de uma célula da planta; importação do polipeptídeo a partir do citosol de uma célula da planta para dentro de um plastídeo da célula; expressão plastídeo-específica do polipeptídeo em uma célula da planta; e/ou localização do polipeptídeo em uma célula da planta. Uma planta semelhante pode ter adicionalmente um ou mais traços desejáveis diferentes de expressão do polipeptídeo codificado. Os traços referidos podem incluir, por exemplo: resistência a insetos, outras pragas, e agentes causadores de doença; tolerâncias a herbicidas; aumento da estabilidade, produtividade, ou vida útil; tolerâncias ambientais; produção farmacêutica; produção de produtos industriais; e melhoramentos nutricionais.

[00177] Uma planta transgênica de acordo com a invenção pode ser qualquer planta capaz de ser transformada com uma molécula de ácido nucleico da invenção. Por conseguinte, a planta pode ser uma dicotiledônea ou uma monocotiledônea. Exemplos não limitantes de plantas dicotiledôneas utilizáveis nos presentes métodos incluem: *Arabidopsis*, alfalfa, feijões, brócolis, repolho, cenoura, couve-flor, aipo, repolho chinês, algodão, pepino, berinjela, alface, melão, revilha, pimentão, amendoim, batata, abóbora, rabanete, colza, espinafre, soja, moranga, beterraba sacarina, girassol, tabaco, tomate, e melancia. Exemplos não limitantes de plantas monocotiledôneas utilizáveis nos presentes métodos incluem: milho, *Brassica*, cebola, arroz, sorgo, trigo, centeio, painço, cana-de-açúcar, aveia, tritcale, *switchgrass*, e *turfgrass*. Plantas transgênicas de acordo com a invenção podem ser usadas ou cultivadas em qualquer maneira.

[00178] Algumas modalidades também proporcionam produtos de base contendo uma ou mais sequências de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28, por exemplo, um produto de base produzido a partir de uma planta ou semente recombinante contendo uma ou mais das sequências de nucleotídeos referidas. Produtos de base contendo uma ou mais sequências de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 incluem, por exemplo e sem limitação: produtos alimentícios, refeições, óleos, ou grãos ou sementes triturados ou inteiros de uma planta compreendendo uma ou mais sequências de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28. A detecção de uma ou mais sequências de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 em uma ou mais commodities ou produtos de base é *de facto* evidência de que a commodity ou o produto de base foi no mínimo em parte produzido a partir de uma planta compreendendo uma ou mais sequências de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28. Em modalidades particulares, um produto de base da invenção compreende uma quantidade detectável de uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28. Em algumas modalidades, os produtos de base referidos podem se produzidos, por

exemplo, obtendo plantas transgênicas e preparando alimento ou ração a partir das mesmas.

[00179] Em algumas modalidades, uma planta ou semente transgênica compreendendo um transgene compreendendo uma sequência de nucleotídeos codificando um polipeptídeo compreendendo no mínimo um peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 também pode compreender no mínimo um outro evento transgênico em seu genoma, incluindo sem limitação: um evento transgênico a partir do qual é transcrita uma molécula de RNAi; um gene codificando uma proteína inseticida (por exemplo, uma proteína inseticida de *Bacillus thuringiensis*); um gene de tolerância a herbicidas (por exemplo, um gene proporcionando tolerância ao glifosato); e um gene contribuindo para um fenótipo desejável na planta transgênica (por exemplo, aumento da produtividade, alteração do metabolismo de ácidos graxos, ou restabelecimento da esterilidade citoplasmática masculina).

VII. Localização de produtos genéticos para plastídeos mediada por TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28

[00180] Algumas modalidades da presente invenção proporcionam um método para expressão e/ou localização de um produto genético para um plastídeo (por exemplo, um cloroplasto). Em modalidades particulares, o produto genético pode ser um produto genético marcador, por exemplo, uma molécula fluorescente. A expressão do produto genético como parte de um polipeptídeo também compreendendo um peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode proporcionar um sistema para avaliar as capacidades de localização de plastídeo de uma sequência de peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 em particular. Em algumas modalidades, a expressão de um produto genético marcador como parte de um polipeptídeo contendo TraP10, TraP11,

TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 é utilizada para direcionar a expressão do produto genético marcador para um plastídeo de uma célula em que o polipeptídeo é expressado. Em determinadas modalidades, um produto genético marcador semelhante é localizado em um ou mais plastídeos da célula hospedeira. Por exemplo, o produto genético marcador pode ser expressado em maiores níveis no ou nos plastídeos do que no citosol ou em outras organelas da célula hospedeira; o produto genético marcador pode ser expressado em níveis muito maiores no ou nos plastídeos; o produto genético marcador pode ser expressado essencialmente somente no ou nos plastídeos; ou o produto genético marcador pode ser expressado inteiramente no ou nos plastídeos, de tal modo que não pode ser detectada expressão no citosol ou em organelas não plastídeos.

[00181] Em algumas modalidades, um polipeptídeo compreendendo um peptídeo variante TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 funcional ligado a um produto genético marcador é usado para avaliar as características do peptídeo variante TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 funcional. Por exemplo, a sequência de um peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 pode ser variada, por exemplo, por introdução de no mínimo uma ou mais mutações conservadoras no peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28, e o peptídeo variante TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 resultante pode ser ligado a um produto genético marcador. Depois de expressão em uma célula hospedeira adequada (por exemplo, uma célula em que um ou mais elementos reguladores no constructo de expressão são operáveis), pode ser determinada a expressão do produto genético marcador. Comparando a localização sub-celular do produto genético marcador entre o constructo de peptídeo TraP-marcador de referência

e o constructo de peptídeo TraP-marcador variante, pode ser determinado se o peptídeo TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 variante proporciona, por exemplo, maior localização de plastídeos, localização de plastídeos substancialmente idêntica, ou menor localização de plastídeos. Identificando variantes de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 que proporcionam maior localização de plastídeos, as mutações em semelhantes variantes de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 podem ser incorporadas em variantes de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 adicionais. Realizando múltiplas rodadas deste processo de avaliação, e incorporando subsequentemente mutações favoráveis identificadas em uma sequência de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28, é possível produzir um processo iterativo para otimização de uma sequência de TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28. As sequências de peptídeos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 otimizadas referidas, e sequências de nucleotídeos codificando os mesmos, são consideradas parte da presente invenção, quer ou não as sequências de peptídeos TraP10, TraP11, TraP17, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, ou TraP28 otimizadas referidas possam ser adicionalmente otimizadas por mutação adicional.

[00182] Todas as referências, inclusive publicações, patentes, e requerimentos de patente, citadas aqui, são por este incorporadas por meio de referência na medida que não sejam inconsistentes com os detalhes explícitos desta invenção, e portanto são incorporadas na mesma extensão como se cada referência fosse individualmente e especificamente indicada para ser incorporada por meio de referência e fosse estipulada em sua totalidade aqui. As referências discutidas aqui, são proporcionadas unicamente para sua revelação antes da da-

ta de registro do presente requerimento. Nada aqui, deve ser considerado como uma admissão de que os inventores não estão intitulado a antedatar a referida invenção em virtude de invenção anterior.

[00183] Os Exemplos que se seguem são proporcionados de modo a ilustrar determinadas características e/ou aspectos particulares. Estes Exemplos não devem ser considerados como limitando a presente invenção às características e/ou aspectos particulares descritos.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Esquema e Produção de Sequências de Peptídeos de Trânsito de Cloroplastos (TraP) Quiméricos

[00184] Plastídeos são organelas citoplasmáticas encontradas em espécies de plantas superiores e estão presentes em todos os tecidos de plantas. Cloroplastos são um tipo específico de plastídeo encontrado em tecidos fotossintéticos verdes os quais são responsáveis por funções fisiológicas essenciais. Por exemplo, uma função fisiológica primária semelhante é a síntese de aminoácidos aromáticos requerida pela planta. Enzimas codificadas nucleares são requeridas neste caminho biossintético e são transportadas do citoplasma para o interior do cloroplasto. Estas enzimas codificadas nucleares geralmente possuem um peptídeo de trânsito N-terminal que interage com a membrana do cloroplasto para facilitar o transporte do peptídeo para o estroma do cloroplasto. Bruce B, (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function, and evolution. *Trends Cell Bio.*, 10: 440-447. Depois da importação, as peptidases do estroma clivam o peptídeo de trânsito, deixando a proteína funcional madura importada dentro do cloroplasto. Richter S, Lamppa GK, (1999) Stromal processing peptidase binds transit peptides and initiates their ATP-dependent turnover in chloroplasts. *Journ. Cell Bio.*, 147: 33-43. Os peptídeos de trânsito de cloroplastos são sequências variáveis as quais são altamente divergentes em comprimento, composição e organização (Bruce, 2000). As similaridades

de sequência dos peptídeos de trânsito de cloroplastos divergem significativamente entre proteínas homólogas de diferentes espécies de plantas. A quantidade de divergência entre os peptídeos de trânsito de cloroplastos é inesperada dado que as proteínas homólogas obtidas a partir de diferentes espécies de plantas tipicamente partilham níveis relativamente elevados de similaridade de sequência quando se compara a proteína funcional madura processada.

[00185] Novas sequências de peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos foram projetadas, produzidas e testadas *in planta*. Foi demonstrado que os novos peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos possuem propriedades de translocação e de processamento eficientes para a importação de proteínas agronômicas importantes dentro do cloroplasto. Inicialmente, sequências de proteínas de diferentes espécies bacterianas e de plantas foram analisadas através do programa de computação ChloroP™ de modo a identificar sequências de peptídeos de trânsito de cloroplastos putativas (Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G, (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science*, 8: 978-984, available at <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>.) Depois dos peptídeos de trânsito de cloroplastos nativos terem sido identificados, as sequências de peptídeos de trânsito de cloroplastos foram alinhadas umas com as outras (**Fig. 2**).

[00186] Utilizando os alinhamentos de sequências de peptídeos de trânsito de cloroplastos, novos peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos foram projetados combinando uma primeira metade da sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos de um primeiro organismo com uma segunda metade da sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos de um segundo organismo em uma proporção aproximada de 1:1. Exemplos de sequências de proteínas dos peptídeos de

trânsito de cloroplastos quiméricos recém projetados são TraP10 (**SEQ ID NO: 1**), TraP11 (**SEQ ID NO: 2**), TraP17 (**SEQ ID NO: 3**), TraP18 (**SEQ ID NO: 4**), e TraP19 (**SEQ ID NO: 5**). Estas novas sequências de peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos são derivadas a partir das proteínas EPSPS de *Brassica napus*, *Glycine max*, *Oryza sativa*, *Amaranthus*, *Calystegia*, e *Dunaliella salina* e *Chlamydomonas reinhardtii*. A sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP10 (**SEQ ID NO: 1**) compreende um N-término o qual é derivado a partir de *Brassica napus*, e o C-término do peptídeo de trânsito de cloroplastos é derivado a partir de *Glycine max*. A sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP11 (**SEQ ID NO: 2**) compreende um N-término o qual é derivado a partir de *Glycine max*, e o C-término do peptídeo de trânsito de cloroplastos é derivado a partir de *Brassica napus*. A sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP17 (**SEQ ID NO: 3**) compreende um N-término o qual é derivado a partir de *Calystegia*, e o C-término do peptídeo de trânsito de cloroplastos é derivado a partir de *Chlamydomonas reinhardtii*. A sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP18 (**SEQ ID NO: 4**) compreende um N-término o qual é derivado a partir de *Oryza sativa*, e o C-término do peptídeo de trânsito de cloroplastos é derivado a partir de *Amaranthus*. A sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP19 (**SEQ ID NO: 5**) compreende um N-término o qual é derivado a partir de *Amaranthus*, e o C-término do peptídeo de trânsito de cloroplastos é derivado a partir de *Dunaliella salina*.

[00187] Do mesmo modo, múltiplas sequências de proteínas de diferentes espécies de plantas foram analisadas através do programa de computação ChloroP™ (Emanuelsson, 1999) para identificar sequências de peptídeos de trânsito de cloroplastos putativas, disponíveis em <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>. Utilizando os alinhamentos de sequências de peptídeos de trânsito de cloroplastos, novos peptídeos

de trânsito de cloroplastos sintéticos foram projetados por meio de seleção aleatória de aminoácidos para produzir uma nova sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos putativa sintética. Exemplos de sequências dos peptídeos de trânsito de cloroplastos sintéticos recém projetados são TraP26 (**SEQ ID NO: 6**), TraP27 (**SEQ ID NO: 7**) e TraP28 (**SEQ ID NO: 8**).

[00188] Os peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos foram testados através de múltiplos ensaios os quais incluíram um sistema de expressão *in planta* transitório e transgenicamente como eventos de transformação estável que continham um elemento de expressão regulador genético fundido a uma sequência de transgene agrônômica importante.

Exemplo 2: Ensaio In Planta Transitório de Sequências de Peptídeos de Trânsito de Cloroplastos (TraP) Quiméricos

Ensaio Transitório do Tabaco:

[00189] As sequências de peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos acima descritas foram inicialmente testadas através de um ensaio transitório *in planta*. Sequências de polinucleotídeos as quais codificam as sequências de peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos TraP10 (**SEQ ID NO: 9**), TraP11 (**SEQ ID NO: 10**), TraP17 (**SEQ ID NO: 11**), TraP18 (**SEQ ID NO: 12**), TraP19 (**SEQ ID NO: 13**), TraP26 (**SEQ ID NO: 14**), TraP27 (**SEQ ID NO: 15**), e TraP28 (**SEQ ID NO: 16**) foram sintetizadas. Uma sequência encadeadora (**SEQ ID NO: 17**) foi incorporada entre a sequência de TraP e a sequência codificante *yfp* de TraP10 e TraP11. Os constructos resultantes continham duas unidades de transcrição de planta (PTU). A primeira PTU consistiu do promotor de Ubiquitina 10 da *Arabidopsis thaliana* (promotor AtUbi10; Callis, *et al.*, (1990) *J. Biol. Chem.*, 265: 12486-12493), do gene de fusão de TraP-proteína fluorescente amarela (TraP-YFP (TraP-yellow fluorescent protein); Pedido de Patente dos Estados Uni-

dos No. 2007/0298412) ou do gene de fusão de TraP-proteína fluorescente verde (TraP-GFP (TraP-green fluorescent protein); Sheen *et al.*, (1995) *Plant J.*, 8(5): 777-84), e da região não traduzida 3' do ORF 23 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3'UTR; Patente dos Estados Unidos No. 5.428.147). A segunda PTU consistiu do promotor do Vírus do Mosaico da Veia da Mandioca (promotor do CsVMV (Cassava Vein Mosaic Virus); Verdaguer *et al.*, (1996) *Plant Molecular Biology*, 31: 1129-1139), da fosfinotricina acetil transferase (PAT (phosphinothricin acetyl transferase); Wohlleben *et al.*, (1988) *Gene*, 70: 25-37) ou do DSM-II (Pedido de Patente Internacional No. 2008070845), e da região não traduzida 3' do ORF 1 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3'UTR; Huang *et al.*, (1990) *J. Bacteriol.*, 172: 1814-1822). O constructo pDAB101979 contém o peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP10 (**Fig. 3**). O constructo pDAB101980 contém o peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP11 (**Fig. 4**). O constructo pDAB107634 contém o peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP17 (**Fig. 5**). O constructo pDAB107635 contém o peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP18 (**Fig. 6**). O constructo pDAB107636 contém o peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP19 (**Fig. 7**). O constructo pDAB109847 contém o peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP26 (**Fig. 8**). O constructo pDAB109848 contém o peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP27 (**Fig. 9**). O constructo pDAB109849 contém o peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP28 (**Fig. 10**). Um plasmídeo de controle, pDAB101908, o qual não continha uma sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos a montante do gene *yfp* foi construído e incluído nos estudos (**Fig. 11**). Os constructos foram confirmados através de digestão enzimática de restrição e sequenciamento. Finalmente, os constructos foram transformados em *Agrobacterium tumefaciens* e armazenados como estoques de glicerol.

[00190] A partir de um estoque de glicerol de *Agrobacterium*, um ciclo completo de cultura congelada foi inoculado em 2 ml de extrato de levedura de peptona dextrose (Yeast-extract Peptone Dextrose) (100 µg/ml de espectinomicina) em um tubo estéril de 14 ml. O meio inoculado foi incubado a 28°C de um dia para o outro com agitação a 200 rpm. No dia seguinte cerca de 100 µl da cultura foram usados para inocular 25 ml de YPD (100 µg/ml de espectinomicina) em um frasco de 125 ml estéril com triplo defletor (*tri-baffled*), e incubado de um dia para o outro a 28°C durante a noite com agitação a 200 rpm. No dia seguinte as culturas foram diluídas até uma OD₆₀₀ de 0,5 em ddH₂O estéril (pH 8,0). A cepa de *Agrobacterium* diluída foi misturada com uma segunda cepa de *Agrobacterium* contendo a proteína helper P19 em uma proporção de 1:1. A cultura foi usada para a infiltração das folhas de tabaco através do método de Voinnet. Voinnet O, Rivas S, Mestre P, and Baulcombe D, (2003) *An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. The Plant Journal*, 33: 949-956. Plantas de tabaco infiltradas foram colocadas em um Conviron™ ajustado a 16 horas de luz a 24°C por no mínimo três dias até serem testadas.

Resultados da Microscopia:

[00191] Folhas de tabaco infiltradas com *Agrobacterium* foram separadas da planta, e colocadas dentro de uma placa de petri com água para prevenir a desidratação. As folhas de tabaco infiltradas foram observadas sob excitação com luz azul com óculos de filtro de passo longo (*long-pass filter glasses*) mantidos no local usando uma lâmpada do tipo Dark Reader Hand Lamp™ (Clare Chemical Research Co.; Dolores, CO) para identificar áreas não danificadas da folha que estavam sucessivamente expressando as proteínas reporter YFP ou GFP. Áreas da folha identificadas especificamente foram dissecadas da folha

e montadas em água para imagiologia por microscopia confocal (Leica TCS-SP5 AOBS™; Buffalo Grove, IL). A YFP foi excitada por uma linha de laser de 514 nm, usando um laser multi-linha de íon de argônio. A GFP foi excitada por uma linha de laser de 488 nm, usando um laser multi-linha de íon de argônio. A largura das aberturas de detecção foi ajustada usando uma amostra de folhas de controle sem expressão (escuro) para excluir autofluorescência das folhas de fundo. A autofluorescência da clorofila foi simultaneamente coletada em um segundo canal para comparação direta com o sinal da proteína reporter fluorescente para determinação da localização cloroplástica.

[00192] Os resultados dos estudos de imagens de microscopia indicaram que a proteína fluorescente YFP ou GFP compreendendo o peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP (TraP10, TraP11, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, e TraP28) acumulou dentro dos cloroplastos localizados no citoplasma das células de tabaco em comparação com as proteínas fluorescentes YFP de controle as quais não foram translocadas para dentro dos cloroplastos do citoplasma das células de tabaco (**Fig. 12** a **Fig. 19**). Deve ser observado que o peptídeo de trânsito TraP17 não translocou proteínas fluorescentes YFP para dentro dos cloroplastos de tabaco, mas o peptídeo de trânsito TraP17 não translocou proteínas fluorescentes YFP para dentro dos cloroplastos de milho. Estes resultados dos estudos de imagens de microscopia sugerem que a translocação da proteína YFP para dentro do cloroplasto foi um resultado do peptídeo de trânsito de cloroplastos TraP. Conforme mostrado nas figuras de microscopia, o sinal de fluorescência YFP está localizado nos cloroplastos os quais também fluorescem em vermelho devido a auto-fluorescência sob as condições de estudos de imagens de microscopia. Comparativamente, A **Fig. 20** proporciona uma imagem de microscopia de tecido de folhas de tabaco infiltradas com o constructo de controle pDAB101908 que não contém um peptídeo de

trânsito de cloroplastos. Os cloroplastos nesta imagem somente fluorescem em vermelho devido a auto-fluorescência sob as condições dos estudos de imagens de microscopia, e estão destituídos de qualquer sinal de fluorescência de YFP que seja apresentado nas células de tabaco infiltradas com TraP. Ao contrário, o sinal de fluorescência de YFP nas células de plantas de tabaco de controle é expressado de maneira difusa por todo o citoplasma das células de plantas de tabaco.

Ensaio Transitório de Protoplastos de Milho:

[00193] Sementes de *Zea mays* c.v. B104 foram esterilizadas superficialmente agitando vigorosamente em 50% de Clorox™ (3% de hipoclorito de sódio), contendo 2 a 3 gotas de Tween® 20, por cerca de 20 minutos. As sementes foram enxaguadas completamente com água destilada estéril. As sementes estéreis foram laminadas sobre meio ½ MS em Phytatrays ou caixas de tipo similar, e deixadas para crescer no escuro (28°C) por 12 a 20 dias. Um ensaio transitório de protoplastos de milho foi usado para obter e transfectar protoplastos de milho de folhas de *Zea mays* c.v. B104. Este ensaio de protoplastos de milho é uma modificação do sistema descrita por Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., e Sheen, J., (2007), *Arabidopsis* Mesophyll Protoplasts: A Versatile Cell System for Transient Gene Expression Analysis, *Nature Protocols*, 2: 1565-1572. As soluções foram preparadas conforme descrito por Yoo *et.al.*, (2007), com a exceção de que a concentração de manitol usada para os experimentos que se seguem foi modificada para 0,6 M.

[00194] A transfecção de 100 a 500 µl de protoplastos ($1-5 \times 10^5$ células) foi completada adicionando os protoplastos a um tubo de microcentrífuga de 2 ml contendo cerca de 40 µg de plasmídeo de DNA, em temperatura ambiente. O volume de DNA foi preferencialmente mantido a cerca de 10% do volume de protoplastos. Os protoplastos e o DNA foram ocasionalmente misturados durante um período de incu-

bação de 5 minutos. Um volume igual de solução de PEG foi lentamente adicionado aos protoplastos e DNA, 2 gotas de uma vez com mesclagem entre a adição das gotas de solução de PEG. Os tubos foram deixados para incubar por cerca de 10 minutos com mesclagem delicada e ocasional. Em seguida, 1 ml de solução W5+ foi adicionado e misturado invertendo o tubo várias vezes. O um ou mais tubos foram centrifugadas por 5 minutos a 75 x g em uma temperatura de 4°C. Finalmente, o sobrenadante foi removido e o pélete foi ressuspensionado em 1 ml de solução WI e os protoplastos foram colocados dentro de uma pequena placa de petri (35 x 10 mm) ou dentro de placas multicaudades de 6 cavidades e incubados de um dia para o outro no escuro em temperatura ambiente. A fluorescência de GFP foi visualizada por microscopia depois de 12 horas de incubação. As condições de microscopia similares às previamente descritas foram usadas para o estudo das imagens.

[00195] Os resultados do estudo de imagens de microscopia indicaram que a proteína fluorescente GFP compreendendo um peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico de TraP17, TraP18, ou TraP19 acumulou dentro dos cloroplastos localizados no citoplasma das células de milho em comparação com as proteínas fluorescentes GFP de controle as quais não foram translocadas para dentro dos cloroplastos dos citoplasma das células de milho (**Fig.21** to **Fig. 23**). Estes resultados do estudo de imagens de microscopia sugerem que a translocação da proteína GFP dentro do cloroplasto foi um resultado do peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP.

Resultados do Western Blot:

[00196] Amostras das plantas de tabaco infiltradas foram avaliadas através de Western blotting. Perfurações de folhas foram coletadas e submetidas a moagem de grânulos. Cerca de 100 a 200 mg de material das folhas foi misturado com 2 BBs (Daisy; Rogers, AR) e 500 ml

de PBST por 3 minutos em um moinho de esferas Kleco™. Em seguida as amostras foram centrifugadas em uma centrífuga a 14.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi removido e ou analisado diretamente através de Western blot ou imunoprecipitado. As imunoprecipitações foram realizadas usando o kit Pierce Direct IP kit™ (Thermo Scientific; Rockford, IL) seguindo o protocolo do fabricante. Aproximadamente, 50 µg de anti-YFP ou anti-GFP foi ligado à resina. As amostras foram incubadas com a resina de um dia para o outro a 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas e elutriadas na manhã seguinte e preparadas para análise combinando volumes iguais de 2x 8M de tampão de amostra de Ureia e em seguida fervendo as amostras por 5 minutos. As amostras fervidas foram passadas sobre um gel SDS-Bis Tris a 4 a 12% em tampão MOPS por 40 minutos. O gel foi em seguida *blotted* usando o Invitrogen iBlot™ (Life Technologies; Carlsbad, CA) seguindo o protocolo do fabricante. A membrana blotted foi bloqueada por 10 minutos usando solução a 5% de leite em pó desnatado em PBS-Tween®. A membrana foi sondada com o anticorpo primário (anticorpo monoclonal anti-GFP ou anti-YFP em coelho) usado em uma diluição a 1:1000 na solução a 5% de leite em pó desnatado em PBS-Tween® por 1 hora. Em seguida, a membrana foi enxaguada três vezes por cinco minutos com PBS-Tween® para remover todo o anticorpo primário não ligado. A membrana foi sondada com um anticorpo secundário monoclonal anti-coelho em anticorpo de cabra (Life Technologies) usado em uma diluição de 1:1000, por 60 minutos. A membrana foi lavada conforme previamente descrito e desenvolvida por adição de substrato Thermo BCIP/NBT™. O substrato colormétrico foi deixado para desenvolver por 5 a 10 minutos e em seguida os blots foram enxaguados com água antes de serem secados.

[00197] Os resultados do Western blot indicaram que a proteína YFP ou GFP foi expressada nas células de tabaco infiltradas para to-

dos os constructos testados. Todos os tecidos das folhas de plantas de tabaco infiltrados expressaram a proteína YFP ou GFP conforme indicado pela presença de uma banda de proteína a qual reagiu com os anticorpos anti YFP ou anti GFP e foi de tamanho equivalente à banda de proteína YFP ou GFP obtida a partir do tecido das folhas da planta de tabaco infiltradas com o constructo de controle YFP ou GFP. Além disso, estes resultados indicaram que os peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos TraP (TraP10, TraP11, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, e TraP28) foram processados e clivados da proteína YFP ou GFP. Os constructos TraP-YFP ou GFP expressam uma banda de proteína pré-processada que é de maior peso molecular do que a proteína de controle YFP ou GFP. A presença de bandas sobre o Western blot as quais são de tamanho equivalente à proteína de controle YFP ou GFP indica que as sequências de peptídeos de trânsito de cloroplastos TraP (TraP10, TraP11, TraP18, TraP19, TraP26, TraP27, e TraP28) foram processadas, deste modo reduzindo o tamanho da YFP ou GFP para um tamanho de peso molecular o qual é equivalente à proteína de controle YFP ou GFP.

Exemplo 3: Sequências de Peptídeos de Trânsito de Cloroplastos (TraP) Quiméricos para Expressão de Transgenes Tolerantes a Insetos em Arabidopsis

Cry2Aa:

[00198] Foi avaliada a eficácia dos peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos TraP11 sobre a expressão da proteína Cry2Aa em *Arabidopsis thaliana*. Plantas de *Arabidopsis* transgênicas as quais continham peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos TraP11 fundidos à proteína Cry2Aa foram avaliadas para tolerância a insetos para a lagarta da soja (SBL) e para a lagarta das flores do tabaco (TBW).

[00199] A sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos quimé-

rico TraP11 foi clonada em um constructo de expressão em planta pDAB107538 (**Fig. 24**) e testada em *Arabidopsis*. Uma nova versão de uma sequência de polinucleotídeos a qual codifica as sequências de peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos Trap11 (**SEQ ID NO: 18**) foi sintetizada e incorporada no constructo de plasmídeo. O constructo resultante continha duas unidades de transcrição em planta (PTU). A primeira PTU consistia no promotor de Ubiquitina 10 de *Arabidopsis thaliana* (promotor AtUbi10; Callis, *et al.*, (1990) *J. Biol. Chem.*, 265: 12486-12493), do gene de fusão TraP11-cry2Aa (Cry2Aa; **SEQ ID NO: 19**), e da região não traduzida 3' do ORF 23 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3'UTR; Patente dos Estados Unidos No. 5.428.147). A segunda PTU consistiu do promotor do Vírus do Mosaico da Veia da Mandioca (promotor do CsVMV (*Cassava Vein Mosaic Virus*); Verdaguer *et al.*, (1996) *Plant Molecular Biology*, 31:1129-1139), do gene *dsm-2* (DSM2; Pedido de Patente dos Estados Unidos No. 2011/0107455), e da região não traduzida 3' do ORF 1 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3'UTR; Huang *et al.*, (1990) *J. Bacteriol.*, 172:1814-1822). O constructo pDAB107538 contém o peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP11. Um plasmídeo de controle, 107617, o qual não continha uma sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos a montante do gene *cry2Aa* foi construído e incluído nos estudos (**Fig. 25**). Os constructos foram confirmados através de digestão enzimática de restrição e sequenciamento. Finalmente, os constructos foram transformados em *Agrobacterium tumefaciens* e armazenados como estoques de glicerol.

[00200] O constructo pDAB107538 foi transformado em *Arabidopsis thaliana* através de transformação de planta mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Em resumo, 12 a 15 plantas de *Arabidopsis thaliana* (Columbia ecotype, Col-0) foram cultivadas dentro de potes de 4 polegadas (10,16 cm) dentro de uma estufa com intensidade da luz de 250

$\mu\text{mol/m}^2$, 25°C, 18/6 horas de luz/escurecimento. Caules de flores primárias foram aparados uma semana antes da transformação. Inóculos de *Agrobacterium* foram preparados incubando 10 μl de estoques de glicerol de *Agrobacterium* recombinante em 100 ml de caldo LB (100 mg/L de Espectinomicina, 50 mg/L de Kanamicina) a 28°C com agitação a 225 rpm por 72 horas. Uma quantidade de culturas de *Agrobacterium* foi medida com um espectrômetro e quando as células atingiram uma OD 600 de 0,8, as células foram colhidas por centrifugação. Em seguida as células foram ressuspensas em 3 a 4 volumes de 5% de sacarose e 0,04% de Silwet-L77™ e 10 $\mu\text{g/L}$ de meio de infiltração de benzamino purina (BA). As partes de planta acima do solo foram mergulhadas dentro de solução de *Agrobacterium* por 5 a 10 minutos, com delicada agitação. As plantas foram em seguida transferidas para a estufa para crescimento normal com rega regular e fertilização até a produção de sementes.

[00201] Cerca de 200 mg(s) de sementes T₁ crescidas foram plantadas uniformemente em bandejas de seleção (bandejas de germinação de 10,5 polegadas (26,67 cm) x 21 polegadas (53,34 cm) x 1 polegadas (2,54 cm) T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN). Plântulas foram pulverizadas com uma solução a 0,20% (20 μl /10 mL de dH₂O) de herbicida glufosinato (Liberty™) em um volume de pulverização de 10 ml/ bandeja (703 L/ha) 5 dias pós-semeadura e novamente em 10 dias pós-semeadura usando um bico de spray de ar comprimido DeVilbiss. Entre 4 a 7 dias depois da segunda aplicação de glufosinato, plantas tolerantes ao herbicida foram identificadas e transplantadas para produção de sementes T₂. As sementes T₂ resultantes foram usadas nos estudos descritos abaixo.

[00202] Uma pequena alíquota de sementes T₂ (cerca de 100 a 200 sementes) para cada evento foi suspensa em 40 ml de solução de agarose a 0,1% e estratificada a frio a 4 °C por 24 horas. As sementes

estratificadas foram em seguida semeadas por pipetação de 10 ml de sementes sobre a superfície de quatro quartos em um quarto de propagação. Os quartos foram preenchidos com meio de solo no. 5 da Sunshine (Sunshine #5 soil media™, Sun Gro; Bellevue, WA) e cobertos ligeiramente com vermiculita fina. As bandejas foram saturadas em fertilizante de Hoagland antes da semeadura e conforme necessário depois disso. Depois da semeadura, foram usados domos de umidade para cobrir as bandejas e em seguida foram colocados dentro de uma câmara de crescimento Conviron™ estabelecida em 24°C com um fotoperíodo de 16 horas. Luzes incandescentes e fluorescentes proporcionaram um nível de luz de 200 PAR. Depois de 5 dias as sementes germinaram e os domos foram removidos. A primeira seleção de transformantes do herbicida foi no dia 6 e a segunda no dia 10. O herbicida Liberty™ (de ingrediente ativo glufosinato-amônio) foi aplicado usando um pulverizador manual de atomizador DeVilbiss em uma taxa de 200 g ai/ha para remover nulidades. Cerca de 25% das plantas foram nulidades conforme esperado. Uma linha de controles de tipo selvagem também foi incluída na seleção e os controles de tipo selvagem tiveram 100% de mortalidade depois de duas aplicações de herbicida. Em 14 dias as plantas estavam prontas para o transplante. Doze plantas foram tiradas de cada evento para bioensaio e transplantadas para dentro de potes de 7,62 cm (3 polegadas) preenchidos com solo Sunshine No. 5 que tinha uma cobertura contra a luz de vermiculita fina. Os quartos foram pré-encharcados com fertilizante de Hoagland antes do transplante e depois disso conforme necessário. Os transplantes foram propagados em uma estufa sem condicionamento do ar estabelecida a 25°C com 14 horas de luz suplementar. O desenvolvimento de *siliqua* foi inibido aparando com tesouras e deste modo criou mais tecido de planta para o ensaio. As plantas estavam prontas para amostragem de DNA em 16 a 18 dias e prontas para bioensaio

em cerca de 23 dias. As plantas transgênicas putativas foram triadas usando ensaios de confirmação molecular e eventos identificados foram avançados para análise de proteínas e resultados de bioensaio.

[00203] As plantas transformadas geralmente apresentam um fenótipo saudável embora algumas plantas fossem de tamanho menor quando comparadas visualmente com as plantas selvagens. Análise do número de cópias de genes para cada constructo de *Arabidopsis* demonstrou resultados de inserção comparável para todos os constructos, com cerca de 50% das plantas tendo ≥ 3 cópias do gene *cry2Aa* de interesse e cerca de 50% tendo 1 a 2 cópias do gene.

[00204] Os níveis de expressão de proteínas Cry2Aa dos eventos de *Arabidopsis* T₁ variaram amplamente. A detecção de proteínas foi completada usando um ensaio ELISA de modo a quantificar a expressão de proteínas Cry2Aa. Geralmente, os níveis de expressão de proteína se correlacionaram com o número de cópias de inserto de filamento T (*T-strand*) para cada evento. Eventos de alto número de cópias de T-strand (por exemplo >3 eventos de inserção) geralmente produziram maiores níveis de expressão média de proteínas do que os eventos de baixo número de cópias de T-strand para ambos os conjuntos de eventos de transformação de *Arabidopsis* (por exemplo eventos pDAB107617 expressando Cry2Aa sem um TraP e eventos pDAB107538 expressando Cry2Aa com um peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP 11).

[00205] A geração T₂ de plantas de *Arabidopsis* expressou valores de proteína Cry2Aa que foram reduzidos em comparação com os valores de expressão das plantas de *Arabidopsis* T₁. Estes resultados indicaram que a expressão de proteínas foi variável entre cada conjunto de eventos. Os níveis médios de expressão de proteína obtidos a partir dos eventos homozigotos foram maiores do que os níveis médios de expressão de proteína obtidos a partir dos eventos hemizigotos para

todos os eventos de plantas testados (por exemplo, eventos sem um TraP [pDAB107617] e com TraP11 [pDAB107538]). Os eventos de *Arabidopsis* os quais continham mais de duas cópias de um inserto de T-strand tiveram maiores níveis de expressão do que os eventos de *Arabidopsis* os quais continham somente uma única cópia. Apesar da diminuição nos níveis de proteína da geração T₁ para a geração T₂, a incorporação do peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP11 dentro dos constructos resultou em eventos de *Arabidopsis* transgênicos os quais expressaram a proteína Cry2Aa.

[00206] Ambos os conjuntos de eventos de *Arabidopsis* T₁ foram testados em experimentos de bioensaios de insetos. Em geral, eventos de alto número de cópias os quais expressaram maiores quantidades de proteína Cry2Aa resultaram em menores quantidades de lesão das folhas em comparação com eventos de baixo número de cópias. Houve uma correlação entre a expressão de proteína e a proteção das folhas tanto contra SBL quanto contra TBW para eventos de *Arabidopsis* expressando Cry2Aa sem um TraP ($r^2=0,49$ [SBL], $0,23$ [TBW]), e para eventos de *Arabidopsis* expressando Cry2Aa com TraP11 ($r^2=0,75$ [SBL], $0,17$ [TBW]). Resultantemente, um aumento na expressão de proteína provocou significativa proteção contra lesão das folhas ($Pr < 0,05$).

[00207] As plantas de *Arabidopsis* foram protegidas contra lesão por SBL tanto pelos eventos de *Arabidopsis* TraP11 quanto pelos eventos de *Arabidopsis* não TraP. A expressão de Cry2Aa com e sem um TraP11 resultou em menos de 30% de lesão das folhas com mínima expressão de proteína de cerca de $1,0 \text{ ng/cm}^2$ para os eventos TraP11:Cry2Aa e cerca de $1,5 \text{ ng/cm}^2$ para eventos Cry2Aa sem um TraP. As avaliações da expressão de Cry2Aa dos eventos de *Arabidopsis* com e sem TraP11 resultou em menos de 20% de lesão das folhas, com mínima expressão de proteína de cerca de $1,1 \text{ ng/cm}^2$ pa-

ra os eventos de *Arabidopsis* TraP11 e cerca de 2,0 a 2,5 ng/cm² para os eventos de *Arabidopsis* não TraP.

[00208] As plantas de *Arabidopsis* foram protegidas contra lesão por TBW tanto pelos eventos de *Arabidopsis* TraP11 quanto pelos eventos de *Arabidopsis* não TraP. Os insetos TBW foram mais sensíveis a proteína Cry2Aa do que os insetos SBL quando alimentados com material de planta obtido a partir dos eventos de *Arabidopsis*. Concentrações de proteína tão baixas quanto cerca de 1,0 e 1,5 ng/cm² de Cry2Aa resultaram em menos de 30% de lesão das folhas quando a proteína Cry2Aa foi expressada em combinação com TraP11 e sem um TraP, respectivamente. No ponto de corte de 20% de lesão das folhas, a proteção das folhas contra eventos de *Arabidopsis* TraP11 resultaram de níveis de cerca de 1,1 ng/cm² de proteína Cry2Aa ao passo que 2,0 a 2,5 ng/cm² de proteína Cry2Aa expressada foi requerido a partir dos eventos de *Arabidopsis* os quais não possuíam um TraP.

[00209] Os peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos TraP11 não reduziram a eficácia da expressão de proteína Cry2Aa e, *Arabidopsis thaliana*. Plantas de *Arabidopsis* transgênicas as quais continham os peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos TraP11 fundidos à proteína Cry2Aa expressaram altos níveis da proteína Cry2Aa a qual proporcionou tolerância a inseto para a lagarta da soja (SBL) e para a lagarta das flores do tabaco (TBW).

Exemplo 4: Sequências de Peptídeos de Trânsito de Cloroplastos (TraP) Quiméricos para Expressão de Transgenes Tolerantes a Herbicida em *Arabidopsis*

DGT28:

[00210] Foi avaliada a eficácia dos peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos TraP26 e TraP27 sobre a expressão da proteína DGT28 (PCT/US2013/024488) em *Arabidopsis thaliana*. Plantas de

Arabidopsis transgênicas as quais continham ou peptídeos de trânsito de cloroplastos quiméricos TraP26 ou TraP27 fundidos à proteína DGT28 foram avaliadas para tolerância a herbicidas para aplicações de glifosato.

[00211] A sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP26 foi clonada em um constructo de expressão em planta pDAB114286 (**Fig. 26**) e testada em *Arabidopsis*. O constructo resultante continha duas unidades de transcrição em planta (PTU). A primeira PTU consistia no promotor de Ubiquitina 10 de *Arabidopsis thaliana* (promotor AtUbi10; Callis, *et al.*, (1990) *J. Biol. Chem.*, 265: 12486-12493), do gene de fusão TraP26-*dgt28* (TraP26-DGT28; **SEQ ID NO: 27**), e da região não traduzida 3' do ORF 23 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3'UTR; US Patent No. 5,428,147). A segunda PTU consistia no promotor do Vírus do Mosaico da Veia da Mandioca (promotor do CsVMV (*Cassava Vein Mosaic Virus*); Verdaguer *et al.*, (1996) *Plant Molecular Biology*, 31:1129-1139), do gene *dsm-2* (DSM2; Pedido de Patente dos Estados Unidos No. 2011/0107455), e da região não traduzida 3' do ORF 1 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3'UTR; Huang *et al.*, (1990) *J. Bacteriol.*, 172:1814-1822). O constructo pDAB114286 contém o peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP26.

[00212] A sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP27 foi clonada em um constructo de expressão em planta pDAB114287 (**Fig. 27**) e testada em *Arabidopsis*. O constructo resultante continha duas unidades de transcrição em planta (PTU). A primeira PTU consistia no promotor de Ubiquitina 10 de *Arabidopsis thaliana* (promotor AtUbi10; Callis, *et al.*, (1990) *J. Biol. Chem.*, 265: 12486-12493), do gene de fusão TraP27-*dgt28* (TraP27-DGT28; **SEQ ID NO: 28**), e da região não traduzida 3' do ORF 23 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF23 3'UTR; Patente dos Estados Unidos No.

5.428.147). A segunda PTU consistia no promotor do Vírus do Mosaico da Veia da Mandioca (promotor do CsVMV (*Cassava Vein Mosaic Virus*); Verdaguer *et al.*, (1996) *Plant Molecular Biology*, 31:1129-1139), do gene *dsm-2* (DSM2; Pedido de Patente dos Estados Unidos No. 2011/0107455), e da região não traduzida 3' do ORF 1 de *Agrobacterium tumefaciens* (AtuORF1 3'UTR; Huang *et al.*, (1990) *J. Bacteriol.*, 172:1814-1822). O constructo pDAB114287 contém o peptídeo de trânsito de cloroplastos quimérico TraP27.

[00213] Ambos os constructos foram confirmados através de digestão enzimática de restrição e sequenciamento. Os constructos foram transformados em *Agrobacterium tumefaciens* e armazenados como estoques de glicerol. Finalmente, os constructos foram transformados em *Arabidopsis thaliana* através do método de transformação mediada por *Agrobacterium* descrito acima.

Transformação de Planta:

[00214] Sementes T₁ transgênicas recém colhidas contendo os cassetes de expressão *dgt-28* e *DSM-2* foram deixadas para secar por 7 dias em temperatura ambiente. Sementes T₁ foram semeadas em bandejas de germinação de 26,5 x 51 cm, cada uma recebendo uma alíquota de 200 mg de sementes T₁ estratificadas (~10.000 sementes) que tinham sido previamente suspendidas em 40 ml de solução de agarose a 0,1% e armazenadas a 4°C por 2 dias até completar os requisitos de dormência e assegurar germinação de sementes sincrônica.

[00215] Mistura de solo Sunshine Mix LP5 soil™ foi coberta com vermiculita fina e subirrigada com solução de Hoagland até ficar úmida, e em seguida deixada para drenar por gravidade. Cada alíquota de 40 ml de sementes estratificadas foi semeada uniformemente sobre a vermiculita com uma pipeta e coberta com domos de umidade por 4 a 5 dias. Os domos foram removidos um dia antes da seleção de trans-

formantes inicial usando spray pós-emergência de glufosinato (selecionando para o gene *dsm-2* co-transformado).

[00216] Sete dias depois do plantio (DAP) e novamente 11 plantas T₁ DAP, (cotilédone e estágio de 2 a 4 folhas, respectivamente) foram pulverizadas com uma solução a 0,2% de herbicida Liberty™ (200 g ai/L de glufosinato, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO) em um volume de pulverização de 10 ml/bandeja (703 L/ha) usando um bico de pulverização de ar comprimido DeVilbiss para liberar uma taxa eficaz de 280 g ai/ha de glufosinato por aplicação. As plantas sobreviventes (plantas em crescimento ativo) foram identificados 4 a 7 dias depois da pulverização final e transplantados individualmente dentro de potes de 7,62 cm (3 polegadas) preparados com meio de de envasamento (Metro Mix 360™). As plantas transplantadas foram cobertas com domos de umidade por 3 a 4 dias e colocadas em uma câmara de crescimento a 22°C como antes ou movidas diretamente para a estufa. Os domos foram em seguida removidos e as plantas foram criadas na estufa (22± 5°C, 50± 30% de umidade ambiente, 14 h de luz:10 h de escuridão, mínimo 500 µE/m²s⁻¹ luz natural + luz suplementar). Análise de confirmação molecular foi completada sobre as plantas T₁ sobreviventes para confirmar que o gene de tolerância ao glifosato tinha integrado de modo estável dentro do genoma das plantas.

Confirmação Molecular:

[00217] Foi confirmada a presença dos transgenes *dgt-28* e *dsm-2* dentro do genoma de plantas de *Arabidopsis* que foram transformadas com pDAB114286 e pDAB114287. A presença destas sequências de polinucleotídeos foi confirmada através de sonda de hidrólise, PCR de cassete de expressão genética (também descrito como PCR de unidade de transcrição em planta; PTU PCR), Western blot, e análise ELISA.

[00218] As plantas de *Arabidopsis* T₁ foram inicialmente triadas para

confirmar a presença do transgene *dgt-28* e *dsm-2* e do promotor AtUbi10. Os eventos foram triados através de PCR de cassete de expressão genética para determinar se o cassete de expressão *dgt* integrou completamente dentro dos genomas da planta sem recombinação. Em seguida, as plantas de *Arabidopsis* T₁ foram triadas através de um ensaio de sonda de hidrólise, análogo ao TAQMAN™. Os dados gerados a partir destes estudos foram usados para determinar o número de cópias de transgene e identificar eventos de *Arabidopsis* selecionados para auto fertilização e avanço para a geração T₂. Os números de cópias foram determinados nas plantas de *Arabidopsis* T₁ usando o ensaio de sonda de hidrólise descrito abaixo. As plantas com números variáveis de transgenes foram identificadas e avançadas para estudos subsequentes de tolerância ao glifosato.

[00219] Amostras de tecido foram coletadas em placas de 96 cavidades e liofilizadas por 2 dias. Foi realizada maceração de tecido fresco com um pulverizador de tecido KLECO™ e contas de tungstênio (Environ Metal INC., Sweet Home, Oregon). Depois de maceração do tecido, o DNA genômico foi isolado em formato de alta produtividade usando o kit Biosprint 96 Plant kit™ (Qiagen, Germantown, MD) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Depois do isolamento, o gDNA foi diluído em uma diluição a 1:3 padrão. Foi realizada determinação do número de cópias de transgene por ensaio de sonda de hidrólise por PCR em tempo real usando o sistema LIGHTCYCLER®480 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Foram projetados ensaios para *dsm-2*, AtUbi10 e o gene de referência interna, *TAFII15* (Genbank ID: NC 003075; Duarte et al., *BMC Evol. Biol.*, 10:61).

[00220] Para amplificação, a mistura LIGHTCYCLER®480 Probes Master mix (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) foi preparada em uma concentração final de 1X em uma reação multiplex de volume de

10 µL contendo 0,1 µM de cada iniciador para *dsm-2* e AtUbi10, 0,4 µM de cada iniciador para *TAFII15* e 0,2 µM de cada sonda (**Tabela 1**). Foi realizada uma reação de amplificação de duas etapas com uma extensão a 60°C por 40 segundos com aquisição de fluorescência. Todas as amostras foram rodadas e os valores do limiar de ciclo médio (Ct) foram usados para análise de cada amostra. Análise dos dados de PCR em tempo real foi realizada usando o software LightCycler release 1.5™ usando o módulo quant relativo e é baseada no método $\Delta\Delta C_t$. Para isto, uma amostra de DNA genômico de um calibrador de cópia única e verificação de 2 cópias conhecidas foram incluídas em cada rodada. Os resultados do número de cópias da tela de sonda de hidrólise foram determinados para as plantas de *Arabidopsis* transgênicas T₁.

Tabela 1. Informação de iniciadores e sondas para ensaio de sonda de hidrólise de *dsm-2*, AtUbi10 e gene de referência interna (*TAFII15*).

Nome do Iniciador	Sequência
DSM2A (SEQ ID NO: 29)	5' AGCCACATCCCAGTAACGA 3'
DSM2S (SEQ ID NO: 30)	5' CCTCCCTCTTTGACGCC 3'
sonda DSM2 Cy5 (SEQ ID NO: 31)	5' CAGCCCAATGAGGCATCAGC 3'
AtUbi10v2Set5-F (SEQ ID NO: 32)	5' CTTCACCGCCTTAGCTTTCT 3'
AtUbi10v2Set5-R (SEQ ID NO: 33)	5' GTGAAGAAGAAGCTTTGGGTA-TTG 3'
AtUbi10v2Set5-FAM (SEQ ID NO: 34)	5' CGTGACCTAGTCGTCCTCG-TCTTT 3'
sonda TAFYI-HEX (SEQ ID NO: 35)	5' AGAGAAGTTTCGACGGATTT-CGGGC 3'
TAFII15-F (SEQ ID NO: 36)	5' GAGGATTAGGGTTTCAACGGAG 3'
TAFII15-R (SEQ ID NO: 37)	5' GAGAATTGAGCTGAGACGAGG 3'

[00221] Um Western blot foi completado para detectar a proteína DGT-28 expressada em amostras de folhas obtidas a partir de plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas. Foram usados métodos conven-

cionais de eletroforese e de blotting com dispositivos Invitrogen™ e reagentes básicos. Gallagher S, Winston S, Fuller S, Hurrell J, "Immunoblotting and Immunodetection" Current Protocols in Immunology 8.10.1 – 8.10.28, November 2008. Eventos transgênicos positivos os quais expressaram a proteína DGT-28 foram detectados usando um anticorpo de coelho anti-DGT-28 como o anticorpo primário com um sistema de detecção de fluorescência anti-coelho (Cy3). A produção de uma proteína DGT-28 intacta através de Western blot indicou que as plantas transgênicas as quais foram avaliadas expressaram a proteína DGT-28 no peso molecular apropriado. Foi observado que os Western blots continham duas bandas de proteínas de diferentes pesos moleculares. Foi sugerida a hipótese de que as duas bandas consistem em uma primeira proteína DGT-28 de menor peso molecular processada que resultou de clivagem do peptídeo de trânsito de cloroplastos do transgene *dgt-28* e uma segunda proteína TraP::DGT-28 maior, de comprimento total que não foi processada e não resultou em clivagem da sequência de peptídeo de trânsito de cloroplastos.

[00222] Ensaios ELISA foram usados para confirmar que os eventos transgênicos identificados usando o Western blot, e ensaios de qPCR expressaram os transgenes. Duas amostras de folhas que tinham 6 mm de diâmetro foram coletadas e colocadas em um suporte de tubos de cluster de 96 cavidades. Em seguida, dois BB's de aço Daisy™ e 200 µl de tampão de extração (50 mM de HEPES, 5,97 g/500 ml, tampão pH 7,5 com 1% de Brij™ 0,5 g/500 ml, inibidores da protease 5 µl/ml) foram adicionados a cada tubo. As amostras foram moídas em um pulverizador de tecido Klecko™ por 3 minutos em configuração máxima. As amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos e 100 µl do sobrenadante foram transferidos para um tubo de amostra vazio. Outros 100 µl de tampão de extração foram adicionados à amostra de planta e moído no moinho de esferas 3 minutos adi-

cionais, centrifugada e 100 µl deste extrato foram combinados com os primeiros 100 µl da solução. Os sobrenadantes combinados foram misturados e analisados no mesmo dia que a coleta.

[00223] Anticorpos monoclonais foram desenvolvidos para os ensaios ELISA. O clone do anticorpo de captura, SW4-8F11, foi revestido sobre uma placa maxisorp a 2 µg/ml em PBS, e incubado de um dia para o outro a 4°C. Em seguida as placas foram lavadas com PBS (10X estoque), Tween®-20 com volumes de quatro cavidades de tampão. As placas de ELISA foram bloqueadas com 200 µl por cavidade de PBS (10X estoque), Tween®-20, e 2% de gelatina de peixe por duas horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS (10X estoque) e Tween®-20 com volumes de quatro cavidades de tampão. As amostras foram preparadas conforme descrito acima e foi aplicada curva padrão a 60 ng/ml com diluições de 2 vezes até 0,94 ng/ml, no tampão que se segue: 50 mM de HEPES, 5,97 g/500 ml, tampão pH 7,5 com 1% de Brij™, 0,5 g/500 ml, inibidores da protease 5 µl/ml. Amostras e padrões foram adicionados a 100 µl por cavidade por duas horas em temperatura ambiente com agitação. Em seguida as placas foram lavadas com PBS (10X estoque) e Tween®-20 com volumes de quatro cavidades de tampão. O clone de detecção de anticorpo, SW4-18F5, conjugado a peroxidase foi adicionada a cada uma a 100 µl por cavidade em uma concentração de 1 µg/ml e incubado por uma hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS (10x estoque) e Tween®-20 com volumes de quatro cavidades de tampão. O substrato TMB™ (Pierce) foi adicionado a 100 µl por cavidade e incubado por aproximadamente 10 minutos ou até o desenvolvimento de cor apropriado. O desenvolvimento de cor foi interrompido com 100 µl por cavidade de 0,4 M de H₂SO₄. As placas foram lidas a 450 nm, usando o software Softmax™. Os dados do ELISA resultante que foram obtidos a partir de eventos T₁ de cópia única demonstraram

uma expressão de proteína DGT-28 média de 77 ng/cm² com um desvio padrão de +/-33 ng/cm².

Tolerância ao glifosato:

[00224] Os transformantes T₁ de *Arabidopsis* (de transformação com pDAB114286 ou pDAB114287) foram primeiro selecionados entre o pano de fundo de sementes não transformadas usando um esquema de seleção de glufosinato. Três quartos ou 50.000 sementes foram analisados para cada constructo de T₁. As plantas T₁ selecionadas foram caracterizadas molecularmente (conforme descrito acima) e eventos com uma gama de número de cópias foram pulverizados com várias taxas de glifosato comercial.

[00225] Plantas de *Arabidopsis* T₁ transgênicas contendo o transgene *dgt-28* foram pulverizadas com diferentes taxas de glifosato. Taxas elevadas foram aplicadas neste estudo para determinar os níveis relativos de resistência (420, 840, 1,680 ou 3,360 g ae/ha). A taxa de uso de glifosato por 1X campo típica é de 1120 g ae/ha. A resposta destas plantas é apresentada em termos de % de lesão visual 2 semanas depois do tratamento (WAT). As plantas de *Arabidopsis* T₁ que foram usadas neste estudo foram de número de cópias variável para o transgene *dgt-28*. As plantas de *Arabidopsis* T₁ *dgt-28* de baixo número de cópias foram auto-polinizadas e usadas para produzir plantas T₂. A **Tabela 2** mostra a comparação de plantas transgênicas *dgt-28*, tirada para um controle selvagem (não transgênico).

[00226] Os dados apresentados mostram plantas individuais apresentando pouca ou nenhuma lesão (<20%), moderada lesão (20 a 40%), ou grave lesão (>40%). Uma média aritmética e um desvio padrão é apresentado para cada constructo usado para transformação de *Arabidopsis*. A extensão em resposta individual também é indicada na última coluna para cada taxa e transformação. *Arabidopsis thaliana* selvagem e não transformada c.v. Columbia serviu como um controle

sensível a glifosato.

[00227] O nível de resposta das plantas à aplicação de glifosato variou. Esta variância pode ser atribuída ao fato de que cada planta representa um evento de transformação independente e deste modo o número de cópias do gene de interesse varia de planta para planta. No entanto, os dados demonstram que *dgt-28* ligado com as sequências de peptídeos de trânsito de cloroplastos de TraP26 e TraP27 proporciona proteção contra glifosato.

Tabela 2. A resposta de *Arabidopsis* T₁ transformada com *dgt-28* a uma gama de taxas de glifosato aplicadas pós emergência, comparada com um controle não transformado. A % de lesão visual foi registrada 14 dias depois da aplicação de glifosato.

TraP26::<i>dgt-28</i> (pDAB114286)	% da Faixa de Lesão (No. de Replicatas)			% da Análise de Lesão		
Taxa de Aplicação	<20%	20 a 40%	>40%	Mé- dia	Desvio padrão	Alcance (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
840 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
1680 g ae/ha de glifosato	4	0	0	10,0	0,0	10
3360 g ae/ha de glifosato	3	1	0	16,3	2,5	15 a 20
TraP27::<i>dgt-28</i> (pDAB114287)	% da Faixa de Lesão (No. de Replicatas)			% da Análise de Lesão		
Taxa de Aplicação	<20%	20 a 40%	>40%	Mé- dia	Desvio padrão	Alcance (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	3	1	0	19,0	8,2	10 a 30
840 g ae/ha de glifosato	3	1	0	15,8	4,3	10 a 20
1680 g ae/ha de glifosato	1	3	0	18,8	2,5	15 a 20

3360 g ae/ha de glifosato	0	4	0	25,0	0,0	25
Selvagem (controle não transformado)	% da Faixa de Lesão (No. de Replicatas)			% da Análise de Lesão		
Taxa de Aplicação	<20%	20 a 40%	>40%	Mé-dia	Desvio padrão	Alcance (%)
0 g ae/ha de glifosato	4	0	0	0,0	0,0	0
420 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
840 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
1680 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100
3360 g ae/ha de glifosato	0	0	4	100,0	0,0	100

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucleico quimérica, caracterizado por compreender: uma sequência de nucleotídeos que codifica um peptídeo de menos de 73 aminoácidos de comprimento, em que o peptídeo é uma dentre SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, e SEQ ID NO: 6, ligado operacionalmente em quadro a uma sequência codificante de nucleotídeos de interesse.

2. Molécula de ácido nucleico quimérica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a sequência codificante de nucleotídeos de interesse é uma sequência codificante de *dsm-2*, uma sequência codificante de *dgt-28*, uma sequência codificante do gene de toxina Bt, uma sequência codificante de *yfp* ou uma sequência codificante de *gfp*.

3. Molécula de ácido nucleico quimérica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a sequência de nucleotídeos que codifica o peptídeo é uma dentre SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, e SEQ ID NO: 14.

4. Molécula de ácido nucleico quimérica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a sequência de nucleotídeos está ligada operacionalmente a uma ou mais sequências reguladoras.

5. Polipeptídeo, caracterizado por ser codificado pela molécula de ácido nucleico, como definida na reivindicação 1.

6. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a sequência codificante de nucleotídeos de interesse codifica um peptídeo biologicamente ativo que está envolvido em um processo selecionado dentre o grupo que consiste em resistência a herbicidas, resistência a vírus, resistência a patógenos bacterianos, resistência a insetos, resistência a nematódeos, resistência a fungos, vigor da planta, produtividade das plantas, tolerância à temperatura, tolerância às condições do solo, tolerância a baixos níveis de luminosidade, tolerância a

baixos níveis de água, tolerância a altos níveis de água, tolerância a meio ambiente químico, cor das sementes, modificação de amido, síntese de aminoácidos, fotossíntese, síntese de ácidos graxos, síntese de óleos, síntese de carotenoides, síntese de terpenoides, síntese de amido, e resistência a herbicidas.

7. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o peptídeo biologicamente ativo é selecionado dentre o grupo que consiste em: acetolactase sintase (ALS), acetolactase sintase mutada, precursores da acetolactase sintase, 3-enolpiruvilshikimato-5-fosfato sintase (EPSPS), DGT-28 EPSPS, CP4 EPSPS, uma EPSPS classe IV, e uma EPSPS classe III.

8. Vetor de expressão em planta, caracterizado por compreender a molécula de ácido nucleico, como definida na reivindicação 4.

9. Método para a produção de um material de planta transgênica, caracterizado por compreender: obter a molécula de ácido nucleico quimérica, como definida na reivindicação 1, e transformar um material de planta com a molécula de ácido nucleico.

10. Uso de uma planta transgênica, parte de planta, célula vegetal ou semente compreendendo SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 ou SEQ ID NO: 14, ligada operacionalmente em quadro a uma sequência codificante de nucleotídeos de interesse, caracterizado por ser para cruzar com uma segunda planta, regenerar uma planta transgênica, plantar ou cultivar um campo de plantas transgênicas, ou produzir produtos de planta.

11. Invenção, caracterizado por quaisquer formas de suas concretizações ou em qualquer categoria aplicável de reivindicação, por exemplo, de produto ou de processo ou uso englobadas pela matéria inicialmente descrita, revelada ou ilustrada no pedido de patente.

FIGURES:

Fig. 1

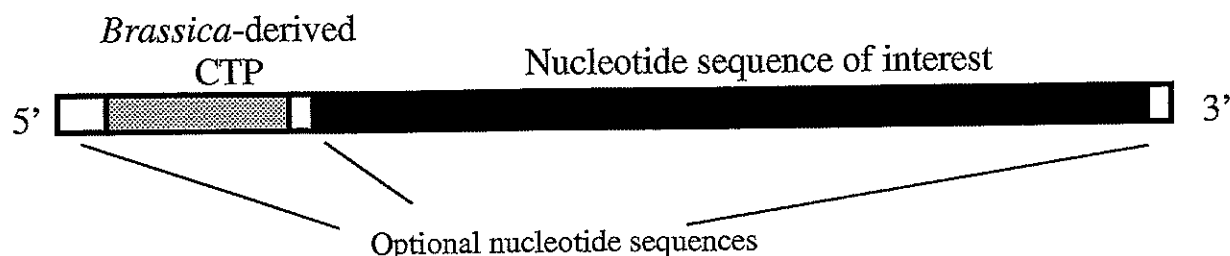


Fig. 2

Dunaliella salina SEQ ID NO:26	(1)	M	R	Q	G	S	L	P	S	C	N	A	G	L	R	R	V	E	V	G	A	L	V	V	P						
Oryza sativa SEQ ID NO:24	(1)	---	---	---	---	---	---	---	---	M	A	A	T	M	S	A	A	A	A	A	V	S	L	D	Q	A	V	A	A	S	
Amaranthus SEQ IDNO:25	(1)	---	---	---	---	---	---	---	---	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
Chlamydamonas reinhardtii SEQ ID NO:23	(1)	---	---	---	---	---	---	---	---	M	L	L	N	O	R	C	R	L	G	R	S	S	K	N	Q	Q	V	A	P	L	A
Calystegia SEQ ID NO:22	(1)	---	---	---	---	---	---	---	---	V	N	N	M	M	M	R	L	S	P	S	N	L	K	P	Q	T	P	L	P	S	H
Glycine max SEQ ID NO:21	(1)	---	---	---	---	---	---	---	---	V	S	R	H	L	A	S	T	Q	I	F	H	S	-	S	N	S	N	K	L	K	
Brassica napus SEQ ID NO:20	(1)	---	---	---	---	---	---	---	---	S	S	R	C	H	C	C	N	P	C	V	I	I	N	L	S	K	S	N	Q	N	K
Dunaliella salina SEQ ID NO:26	(31)	R	P	I	S	*	V	N	D	V	P	H	V	Y	A	P	L	S	V	A	R	R	S	C	S	K	S	I	R		
Oryza sativa SEQ ID NO:24	(26)	A	F	S	*	R	K	O	R	L	P	A	A	R	G	G	R	V	R	V	R	A	R	G	R	E	A				
Amaranthus SEQ IDNO:25	(30)	*	K	*	T	L	N	F	G	---	S	N	L	R	I	P	K	T	S	L	T	N	K	R	V	G	G	O	S		
Chlamydamonas reinhardtii SEQ ID NO:23	(29)	R	P	S	L	*	S	S	A	S	S	V	P	A	P	A	C	S	---	A	P	A	G	I	R						
Calystegia SEQ ID NO:22	(30)	L	L	G	S	N	S	K	N	*	S	S	V	V	K	F	F	K	T	G	K	D	S	I	F	T	A	R			
Glycine max SEQ ID NO:21	(29)	V	N	V	L	*	R	P	R	L	W	G	A	K	S	R	P	M	H	K	N	G	S	F	M	G	N	F			
Brassica napus SEQ ID NO:20	(30)	P	F	V	L	*	K	T	H	Q	P	R	A	S	W	G	K	K	S	G	T	M	L	N	G	V	I				
Dunaliella salina SEQ ID NO:26	(61)	S	T	R	---	Q	T	T	---	C	S	---																			
Oryza sativa SEQ ID NO:24	(56)	V	V	---	---	---	---	---	---																						
Amaranthus SEQ IDNO:25	(58)	I	V	P	---	Q	A	S	---	A	---																				
Chlamydamonas reinhardtii SEQ ID NO:23	(56)	R	A	V	---	R	---	---	---																						
Calystegia SEQ ID NO:22	(60)	S	P	---	---	R	---	---	---																						
Glycine max SEQ ID NO:21	(59)	N	V	G	---	G	N	S	G	---	F	K	V	S																	
Brassica napus SEQ ID NO:20	(60)	R	P	---	---	T	A	S	---	S	---																				

Fig. 3

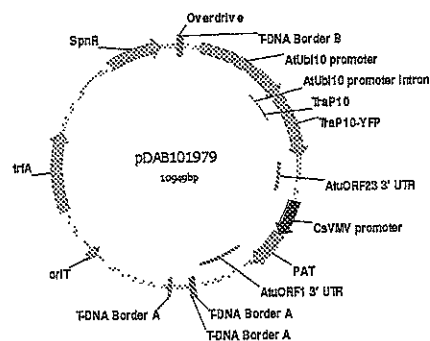


Fig. 4

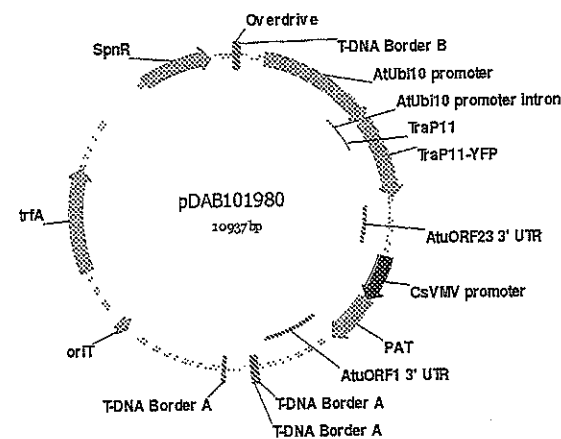


Fig. 5

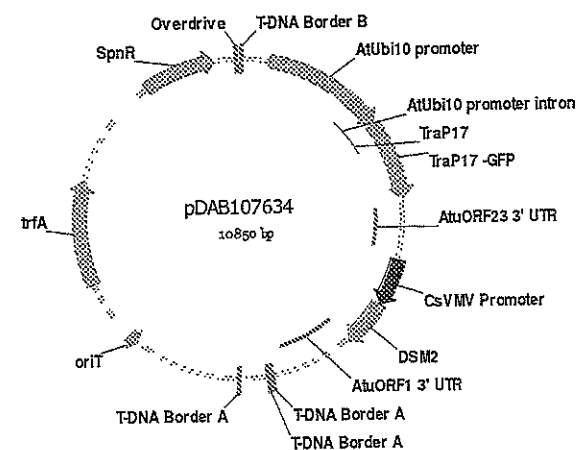


Fig. 6

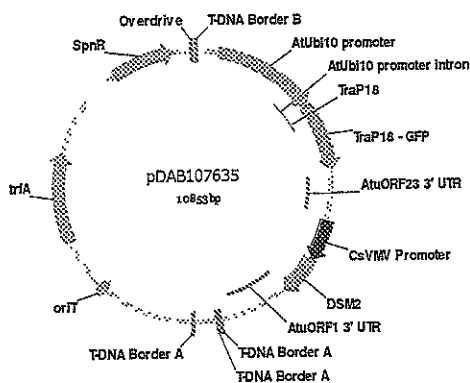


Fig. 7

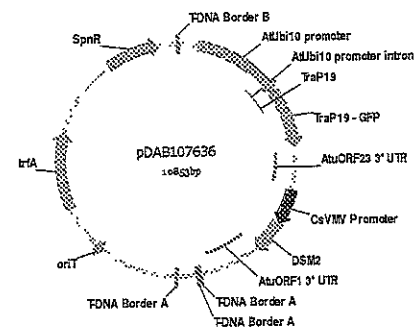


Fig. 8

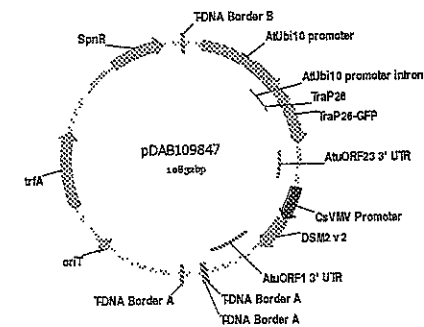


Fig. 9

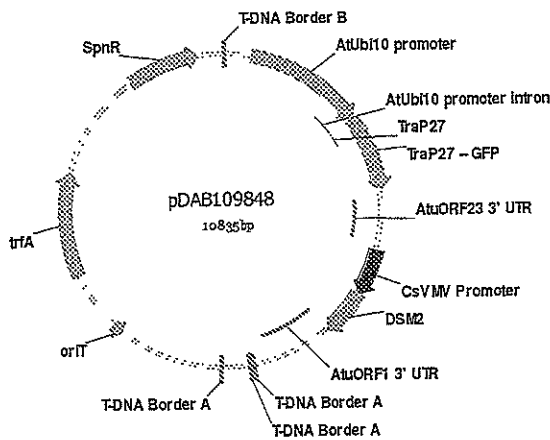


Fig. 10

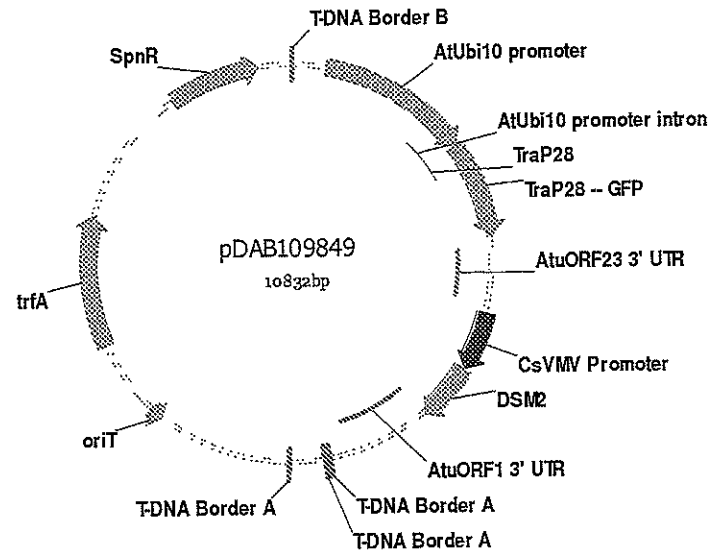


Fig. 11

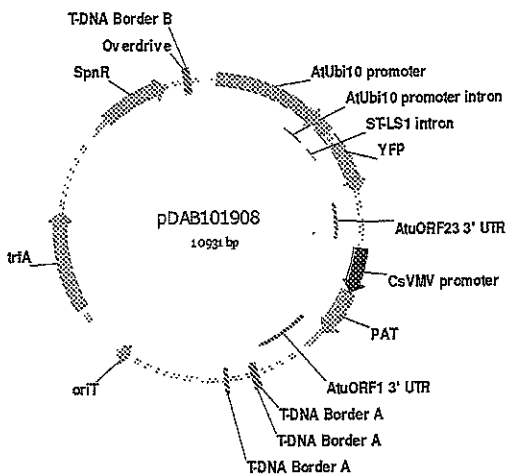


Fig. 12

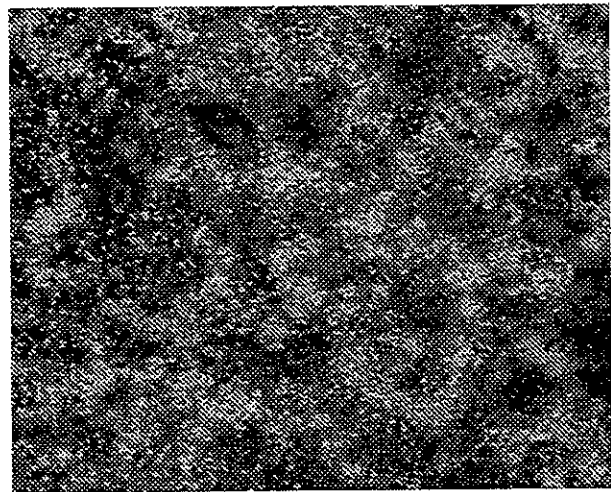
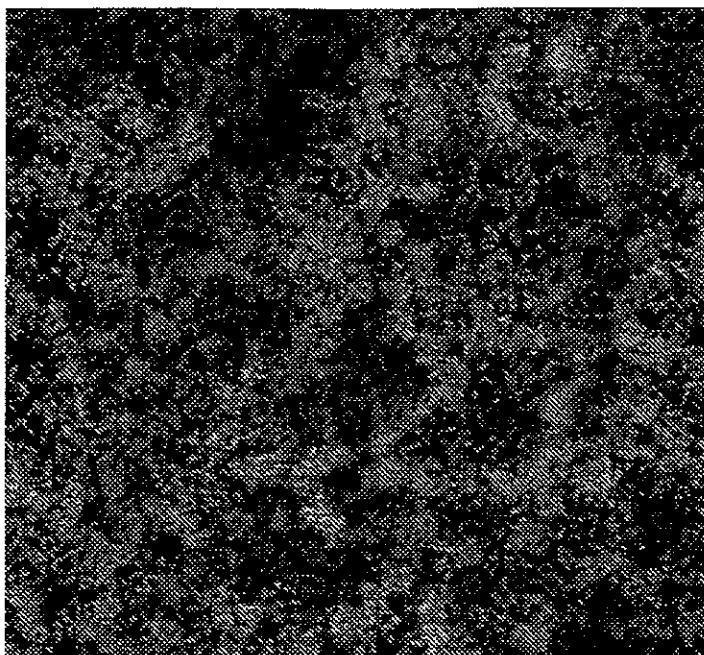


Fig.13



69716-US-PSP

Fig.14

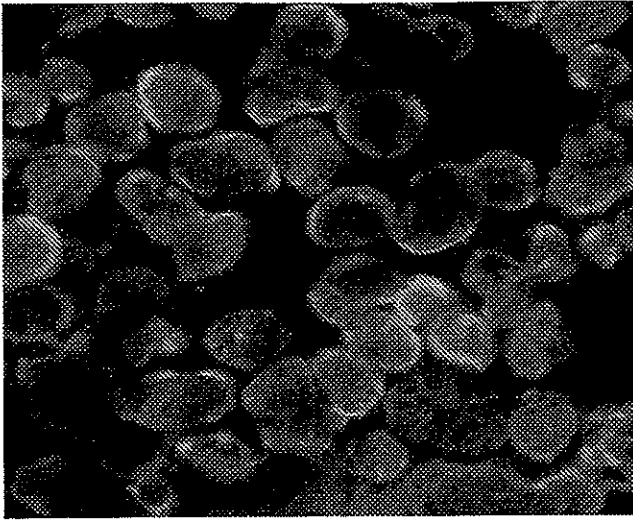


Fig.15

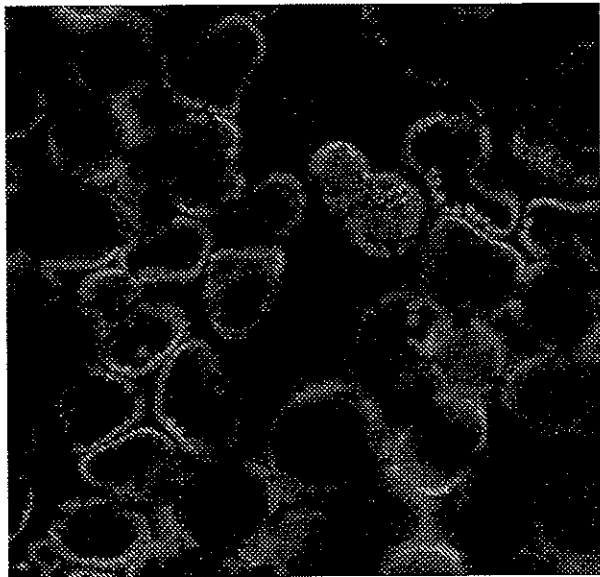


Fig.16

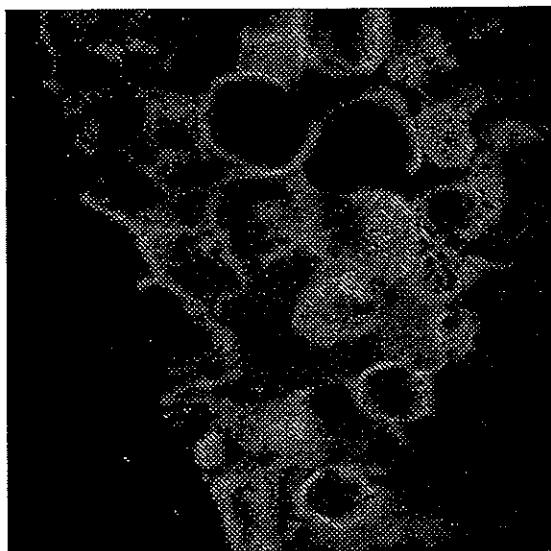
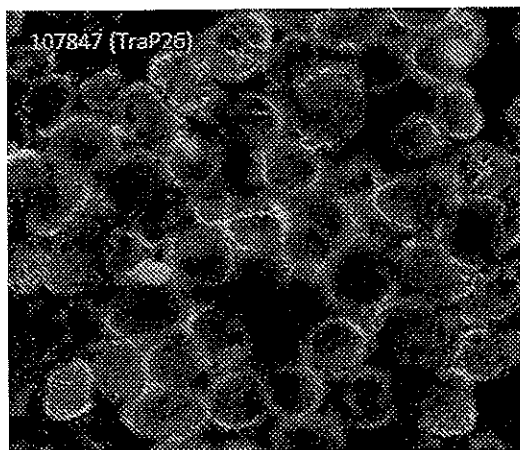


Fig.17



69716-US-PSP

Fig.18

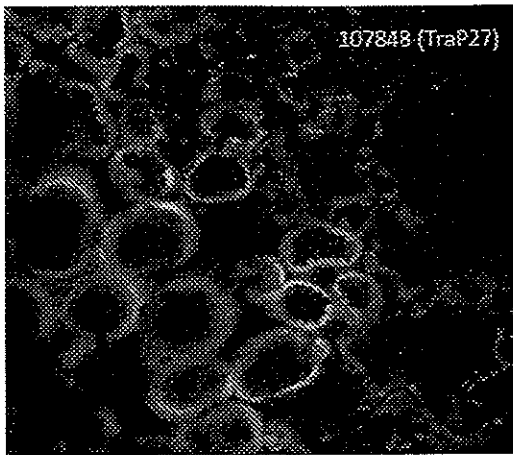
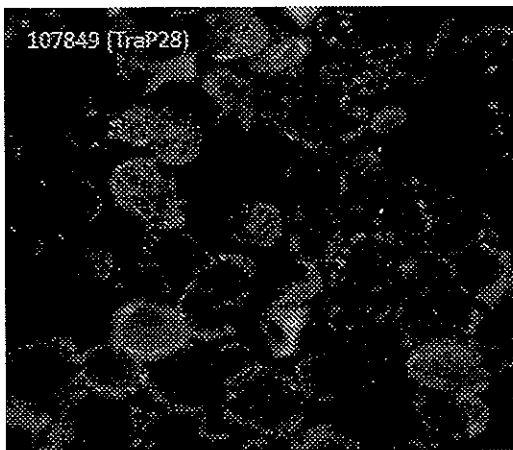


Fig.19



69716-US-PSP

Fig.20

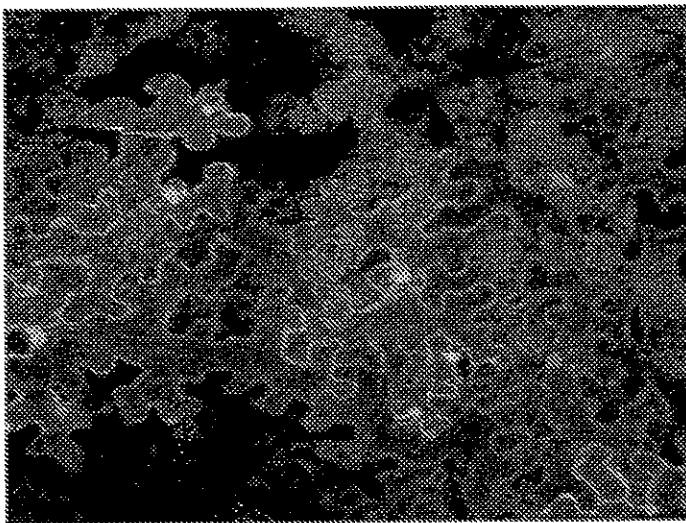
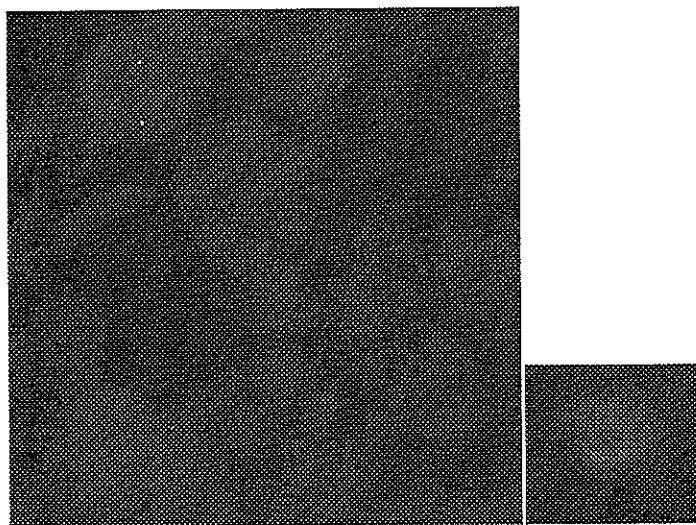


Fig. 21

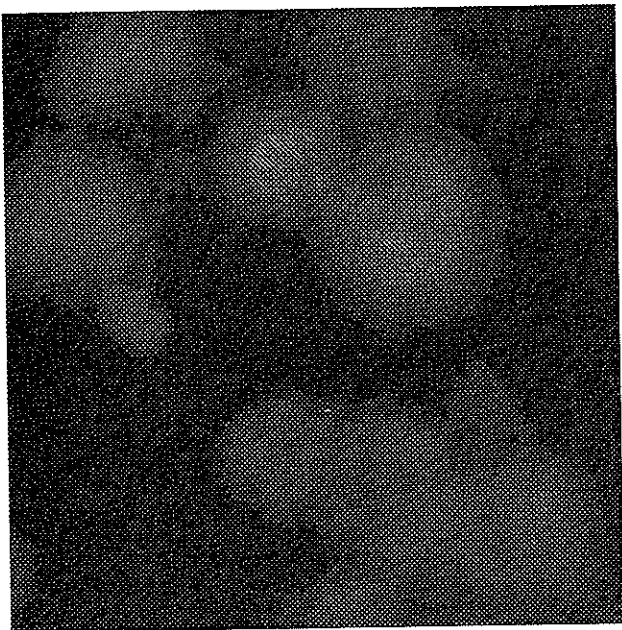


69716-US-PSP

Fig. 22



Fig. 23



69716-US-PSP

Fig. 24

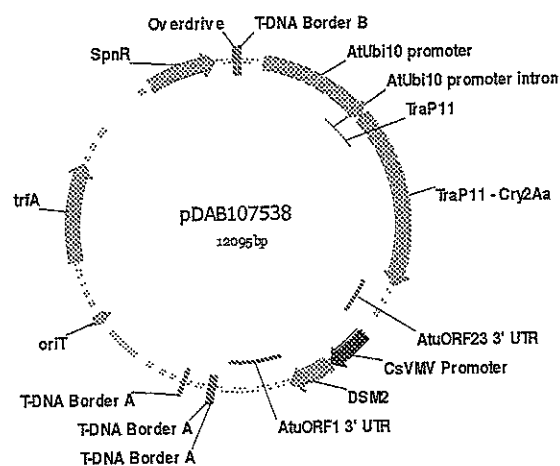


Fig. 25

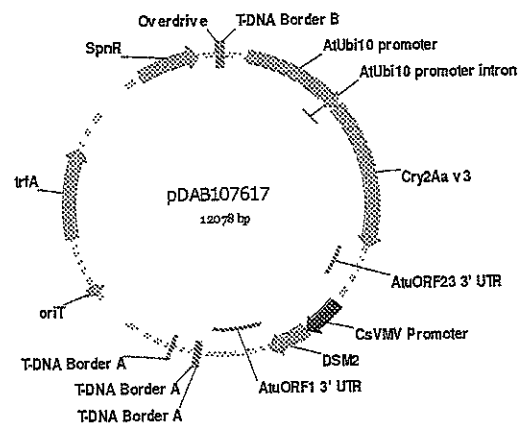
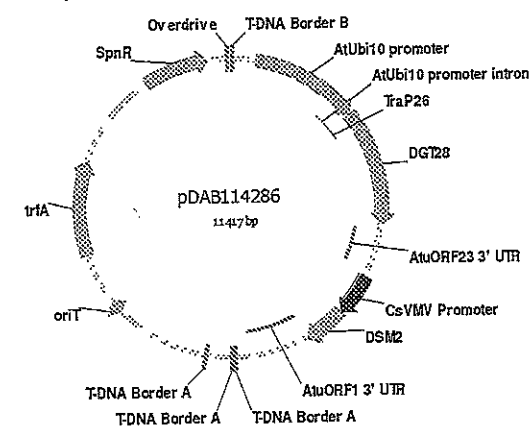
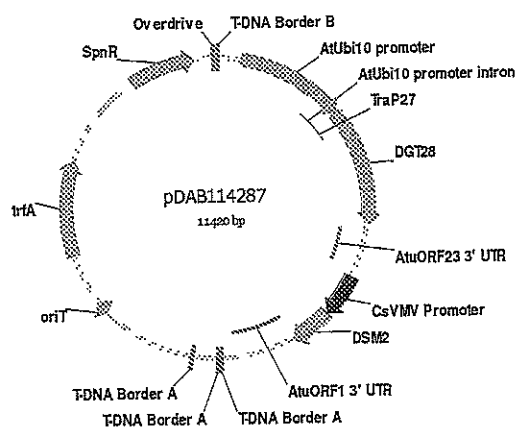


Fig. 26



69716-US-PSP

Fig. 27



69716-US-PSP

RESUMO

Patente de Invenção: **"MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO QUIMÉ-
RICA, POLIPEPTÍDEO, VETOR DE EXPRESSÃO EM PLANTA, MÉ-
TODO PARA A PRODUÇÃO DE UM MATERIAL DE PLANTA
TRANSGÊNICA E USO DE PLANTA TRANSGÊNICA OU PARTES
DA MESMA".**

A presente invenção refere-se a composições e métodos para o direcionamento de peptídeos, polipeptídeos, e proteínas para plastídeos de células contendo plastídeo. Em algumas modalidades, a presente invenção refere-se a peptídeos de trânsito de cloroplastos que podem direcionar um polipeptídeo para um plastídeo, e moléculas de ácido nucleico codificando os mesmos. Em algumas modalidades, a presente invenção refere-se a métodos para a produção de um material de planta transgênica (por exemplo, uma planta transgênica) compreendendo um peptídeo de trânsito de cloroplastos, bem como materiais de planta produzidos pelos métodos referidos, e produtos de base de plantas produzidos a partir dos mesmos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P223358 EV ListSeq - AGO 2019.txt
- Data de Geração do Código: 19/08/2019
- Hora de Geração do Código: 16:10:59
- Código de Controle:
 - Campo 1: F0B573CD0E36C8FB
 - Campo 2: 2E4DEF00250E46AE