

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 667**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03774694 .8**
96 Fecha de presentación: **07.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1554387**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.07.2005**

54 Título: **Transformación de plastos**

30 Prioridad:
15.10.2002 US 418596 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.05.2012

73 Titular/es:
**SYNGENTA PARTICIPATIONS AG
SCHWARZWALDALLEE 215
4058 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**BOUDREAU, Eric;
GU, Weining;
DE FRAMOND, Anic y
HEIFETZ, Peter**

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 381 667 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Transformación de plastos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la transformación de plastos. La invención proporciona vectores y métodos de transformación para obtener plantas o algas transplastómicas que tienen un plasto transformado que comprenden los pasos de introducción en los plastos de una molécula o vector de ácido nucleico recombinante, y dos fases de selección, utilizando la primera fase de selección un compuesto no letal y utilizando una segunda fase de selección un compuesto letal. Como alternativa, el método de selección dual se conduce simultáneamente, utilizando una concentración menor del compuesto letal.

10

Antecedentes de la invención

15

La mejora de variedades de plantas por transformación ha adquirido una importancia creciente para la reproducción moderna de las plantas. Diversas tecnologías de transferencia de genes permiten la incorporación de moléculas de DNA extraño en los genomas de las plantas. La expresión de genes codificados por tales moléculas de DNA extraño (transgenes, genes de interés) puede conferir en potencia nuevas características beneficiosas a la planta como, por ejemplo, calidad o rendimiento mejorados de la cosecha. La expresión de transgenes puede permitir también el uso de las plantas como factorías bioorgánicas.

20

25

La mayoría de los sistemas de transferencia de genes, tales como la transformación mediada por *Agrobacterium* o el bombardeo con partículas recubiertas de DNA, integran de manera estable genes heterólogos en el genoma nuclear de la planta por medio de recombinación no homóloga. La ingeniería de las plantas utilizando estos métodos presenta varios inconvenientes. Estos métodos producen una población de transformantes que varía en el número de copias de su transgén y cuya expresión es a menudo impredecible debido a variaciones de efecto de posición o posible silenciación de genes. La mayoría de las plantas transgénicas producidas por estos métodos contienen en su genoma nuclear secuencias de vectores no deseadas asociadas con el gen de interés. Adicionalmente, la amenaza de contaminación del transgén de plantas salvajes afines por la planta genéticamente modificada es un problema ambiental importante. El riesgo de escape de transgenes de cosechas alteradas genéticamente a sus afines salvajes se origina predominantemente por diseminación del polen.

30

35

La transformación de genes de plastos es una alternativa importante para la expresión de genes heterólogos en plantas (revisado por Bogorad, Trends Biotechnol, 18: 257-263, 2000 y Bock, J. Mol. Biol. 312: 425-438, 2001). Aunque los genomas de los plastos son de tamaño relativamente pequeño, 120 a 160 kb, los mismos pueden acomodar fácilmente varias kilobases de DNA extraño en su interior. La inserción de DNA extraño en el genoma del plasto ocurre principalmente por recombinación homóloga, y un transgén puede dirigirse de modo orientado a un locus particular utilizando regiones flanqueantes homólogas adecuadas. Una de las ventajas principales de la transformación de plastos es que es posible obtener una expresión muy alta del transgén. El genoma del plasto (plastoma) es altamente poliploide, por lo que el transgén se expresa a partir de copias múltiples del gen en el plasto. La poliploidía del genoma de los plastos es tal que una célula de hoja madura puede contener más de 10.000 copias del plastoma. Como factor que contribuye también al alto nivel de la expresión del transgén en los plastos se encuentra la ausencia de los efectos de posición y silenciación de genes. Otra ventaja importante es que los plastos de la mayoría de las plantas de cosecha se heredan sólo por vía materna y por consiguiente, el riesgo ecológico de escape de transgenes de plastos por cruzamiento exogámico mediado por el polen se minimiza.

40

45

50

Las técnicas básicas de suministro de DNA para transformación de plastos son la vía de bombardeo con partículas de las hojas o la incorporación de DNA mediada por polietilenglicol en protoplastos. La transformación de plastos por biolística se realizó inicialmente en el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton et al., Science 240: 1534-1537, 1988) y este método, utilizando selección para loci con acción cis de resistencia a los anti-bióticos (resistencia a espectinomomicina/estreptomicina) o complementación de fenotipos mutantes no-fotosintéticos, se extendió a *Nicotiana tabacum* (Svab et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8526-8530, 1990), *Arabidopsis* (Sikdar et al., Plant Cell Reports 18:20-24, 1991), *Brassica napus* (WO 00/39313), patata (Sidorov et al., The Plant Journal 19(2):209-216, 1999), petunia (WO 00/28014), tomate (Ruf et al., Nature Biotechnology 19: 870-875, 2001), colza de semilla oleaginosa (Hou et al., Transgenic Res. 12: 111-114, 2003) y *Lesquerella fendleri* (Skarjinskaia et al., Transgenic Res. 12: 115-122, 2003). La transformación en plastos de protoplastos de tabaco y del musgo *Physcomitrella patens* se ha conseguido utilizando incorporación de DNA mediada por polietilenglicol (PEG) (O'Neill et al., Plant J. 3: 729-738, 1993; Koop et al., Planta 199: 193-201, 1996). Más recientemente, la micro-inyección de DNA directamente en plastos de células marginales mesófilas de plantas intactas de tabaco dio como resultado una expresión transitoria (Knoblauch et al., Nature Biotechnology 17: 906-909, 1999) pero no se ha informado hasta ahora de transformantes estables utilizando esta técnica. Se ha publicado también la transformación estable de cloroplastos por biolística para la Euglenofita *Eugena gracilis* (Doetsch et al., Curr. Genet. 39: 49-60, 2001) y el alga roja unicelular *Porphyridium* sp (Lapidot et al., Plant Physiol. 129: 7-12, 2002), el marcador dominante seleccionable utilizado para la última consiste en una forma mutante del gen codificante de acetohidroxiácido-sintasa que confiere tolerancia al herbicida sulfometurón-metilo. Como se ha mencionado anteriormente, la transformación de cloroplastos consiste en la integración de un DNA extraño en una posición precisa en el genoma del plasto por recombinación

65

homóloga. Los vectores de transformación de plastos están constituidos por DNA del plasto clonado, homólogo a la región diana, que flanquea un gen marcador seleccionable que está enlazado a su vez a un gen o varios genes de interés. Después de la transformación, el o los transgenes y el marcador seleccionable se insertan juntos como un bloque de secuencia heteróloga en el locus diana del genoma del plasto por recombinación homóloga entre los vectores secuencia del plasto y el locus diana. Para obtener plantas homoplásmicas transformadas de manera estable, es decir plantas que tengan el DNA extraño insertado en cada copia del plastoma de la célula de la planta, se requieren varias tandas de subcultivo en medios selectivos. Este proceso facilita la segregación de plastos transplastómicos y no transformados y da como resultado la selección de células homoplásmicas con uno o más genes de interés y el marcador seleccionable integrado de manera estable en el plastoma, dado que estos genes están enlazados unos a otros.

La mayoría de las transformaciones estables de plastos demostradas hasta la fecha se han basado en selección utilizando el gen *aadA* de resistencia a antibióticos (como se ha indicado arriba en las referencias anteriores) o NPTII (Carrer et al., Mol Gen Genet 241: 49-56, 1993), para obtener plantas homoplásmicas. La eficiencia de transformación de la transformación de plastos podría aumentarse sustancialmente por el empleo de un gen *aadA* quimérico, que confiere resistencia contra Espectinomicina y Estreptomycin (Svab y Maliga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 913-917). Estos marcadores seleccionables confieren un fenotipo de selección específico, la pigmentación verde (US 5.451.513), que permite distinguir visualmente las células transplastómicas pigmentadas en verde de las células que tienen plastos de tipo salvaje que no se pigmentan en las condiciones seleccionadas.

La mayoría de los métodos de transformación de plastos están basados en el uso de un marcador seleccionable que confiere una selección no letal. Estos marcadores seleccionables confieren también un fenotipo de selección específico, la pigmentación verde (Patente U.S. No. 5.451.513) que permite distinguir visualmente las células transplastómicas pigmentadas en verde de las células que tienen plastos de tipo salvaje que no se pigmentan en las condiciones seleccionadas. Por ejemplo, plantas transformadas con el gen bacteriano *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin crecen normalmente en presencia de uno cualquiera de estos antibióticos, mientras que las plantas no transformadas pierden su color. Las plantas transformadas pueden identificarse por tanto fácilmente utilizando clorofila como marcador visual. Existe un número limitado de marcadores seleccionables disponibles para transformación de plastos, y los más fiables, tales como *aadA* o mutaciones puntuales en los genes 16S rDNA y *rps12* de los plastos confieren resistencia a los mismos antibióticos, espectinomicina y/o estreptomycin. Se demostró que marcadores seleccionables que confieren resistencia a otros antibióticos tales como kanamicina son mucho menos eficaces para transformación de plastos.

Han surgido problemas acerca de los genes de resistencia a los antibióticos en cosechas genéticamente modificadas (GM) debido a los riesgos potenciales de transferencia horizontal de genes a microorganismos en el ambiente o a microbios del tubo digestivo. Estos riesgos potenciales pueden plantear problemas aún mayores en el caso de las plantas transplastómicas debido a las características procariotas del genoma de los plastos y al número mucho mayor de copias del transgén por célula. Por esta razón es sumamente deseable obtener plantas transplastómicas sin genes de resistencia a los antibióticos.

Otra alternativa son métodos en los cuales el gen de resistencia a los antibióticos se elimina después de la transformación. Una vez que las plantas son homoplásmicas para el transgén, la presencia del gen marcador seleccionable en el plastoma ya no es necesaria. La eliminación del marcador seleccionable de una planta transplastómica se ha logrado por dos métodos diferentes. El primer método, desarrollado inicialmente para reciclaje del marcador seleccionable de un plastoma transformado de *C. reinhardtii* (Fischer et al., Mol. Gen. Genet. 251: 373-80, 1996) y se ha extendido recientemente a *Nicotiana tabacum* (Iamtham y Day, Nat. Biotechnol. 18: 1172-1176, 2000), está basada en el sistema de recombinación homóloga de los plastos para delectar el gen marcador del genoma del plasto. La recombinación homóloga entre secuencias repetidas directas que flanquean el marcador seleccionable da como resultado la delectión del segmento de DNA. Este método requiere varias tandas de autocruzamiento o retrocruzamiento antes que se obtengan las plantas transgénicas sin el marcador seleccionable. El segundo método utiliza el sistema de recombinación Cre/lox ((Hajdukiewicz et al., The Plant J. 27: 161-170, 2001; Comeille et al., The Plant J. 27: 171-179, 2001) para escindir el segmento de DNA. En este método, la proteína Cre media la escisión de un segmento de DNA localizado entre dos sitios *lox* en orientación directa repetida. Para eliminar el marcador seleccionable, se introduce el gen Cre en los núcleos de las plantas transplastómicas sea por transformación nuclear o por cruzamiento. Una vez que se retira el gen marcador seleccionable, se elimina el gen Cre por cruzamiento genético. Aunque ha alcanzado éxito, la retirada del marcador seleccionable utilizando uno cualquiera de estos métodos presenta ciertas desventajas. Ambos métodos son procesos laboriosos dado que puedan requerirse tandas de cruzamiento múltiples, y ambos métodos dejan un segmento de DNA heterólogo residual indeseable en el genoma del plasto que no sirve para propósito alguno. Adicionalmente, se observó recombinación inespecífica que causaba delectiones de DNA con el sistema de recombinación Cre/lox (Hajdukiewicz 2001), Así pues, existe necesidad de desarrollar otros métodos para obtener plantas transplastómicas sin la integración estable de un marcador seleccionable de antibióticos en el genoma del plasto.

La aplicación de genes de resistencia a antibióticos como el marcador seleccionable para transformación de plastos se ve limitada también por el requerimiento de la pigmentación verde como el fenotipo de selección. Una selección basada en pigmentación verde precisa llevarse a cabo a la luz, lo que puede no ser la condición de cultivo óptima para algunos cultivos de células de plantas. Adicionalmente, no todos los tipos de tejido exhiben el fenotipo de pig-

mentación verde en condiciones de cultivo normales, tales como la mayoría de los cultivos de células de cosechas de cereales. Por tanto, es deseable desarrollar una estrategia de selección para transformación de plastos en la cual la selección no sea dependiente de la pigmentación verde.

- 5 Ciertos genes no marcadores de resistencia a antibióticos, tales como el gen de la protoporfirinogeno-oxidasa (US 6.084.155), los genes de 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato-sintasa (Daniell et al., *Nature Biotech* 16: 345-348, 1998; Ye et al., *The Plant Journal* 25(3): 261-270, 2001), y el gen *bar* (Lutz et al., *Plant Physiology* 125: 1585-1590, 2001), pueden expresarse eficazmente en plantas transplastómicas. Muy recientemente, se ha informado también que los genes EPSPS y *bar* se han utilizado en un método de segregación para obtener plantas transplastómicas resistentes a herbicidas con exclusión de genes antibióticos (Ye et al., *Plant Physiology* 133: 402-410, 2003).

- 10 Otra alternativa consiste en la utilización de la betaína-aldehído-deshidrogenasa de espinaca como el marcador seleccionable que confiere resistencia al compuesto letal betaína-aldehído (Daniell et al., *Curr Genet* 2001, 39: 109-116, 2001). US 2002/0042934 describe un método de selección en dos fases para obtención de plantas transplastómicas por utilización de un marcador no letal y un marcador letal, en el cual los dos marcadores están localizados en plásmidos separados. Este método tiene la desventaja de una eficiencia bastante baja resultante de tasas bajas de co-transformación.

- 15 La presente invención proporciona métodos para transformación de plastos en una gran diversidad de especies de plantas y algas. La misma aborda el problema de eliminación del marcador de resistencia a antibióticos que se suministra a los plastos durante la transformación y proporciona métodos de selección para plantas homoplásmicas transplastómicas en los cuales la pigmentación verde del fenotipo seleccionado no es un requisito previo.
Breve Descripción de las Figuras

- 25 Figura 1: Mapa del vector de transformación de plastos pEBPPot (SEQ ID NO: 1). Las secuencias de direccionamiento a plastos pDNA 16rDNA y *rps12/7* se representan por líneas sombreadas. Los componentes del gen quimérico *ppo* de *A. thaliana* son el promotor del gen de plastos del maíz 16S PEP-NEP rRNA fusionado al *rbcL* RBS de plastos de *N. tabacum* (SEQ ID NO: 4; PmrrN), el gen *ppo* de *A. thaliana* (Atppo) y la 3'UTR *rps16* de plastos de *N. tabacum* (3' *rps16*). Los componentes del gen quimérico *aadA* son el promotor *psbA* de *N. tabacum* (PpsbA) fusionado a *aadA*, la secuencia codificante *aadA* (*aadA*) y la 3'UTR de *psbA* de *A. thaliana* (3'*psbA*). La resistencia a ampicilina en la secuencia vectora de la cadena principal (*amp*) está codificada por el gen *bla* y se indica por una flecha. Están marcados los sitios de restricción para PstI, NdeI, EcoRI, EcoRV, BamHI y Scal.

- 35 Figura 2: Mapa del vector de transformación de plastos pEB8 (SEQ ID NO: 2). Las secuencias de direccionamiento de plastos pDNA 16rDNA y *rps12/7* se representan por líneas sombreadas. Los componentes del gen quimérico *ppo* de *A. thaliana* son el promotor *psbA* de *N. tabacum* (PpsbA), el gen *ppo* de *A. thaliana* (Atppo) y la 3'UTR del plasto *rps16* de los plastos de *N. tabacum* (3' *rps16*). Los componentes del gen quimérico *aadA* son el promotor de plastos *clpP* de *N. tabacum* (PclpP), la secuencia codificante *aadA* (*aadA*) y la 3'UTR *rps16* de los plastos de *N. tabacum* (3' *rps16*). El gen de resistencia a ampicilina en la secuencia vectora de la cadena principal (*amp*) está codificado por el gen *bla* y se indica por una flecha. Están marcados los sitios de restricción para: **PstI, NdeI, EcoRI, EcoRV, BamHI y Scal.**

- 45 Figura 3: Mapa del vector de transformación de plastos pNY2C (SEQ ID NO: 3). Las secuencias de direccionamiento a los plastos 1 (número de acceso NC_001879 posición 96811 a 97844), 2 (posición 95356 a 96811) y 3 (posición 93132 a 95351) para recombinación homóloga están subrayadas. El gen quimérico *aadA* está insertado dentro del gen esencial *ycf2* en la posición 95351 del genoma de plastos del tabaco. El gen *ppo* quimérico de *A. thaliana* está insertado en la región intergénica entre los genes de los plastos *ndhB* y *trnL* en la posición 96811 del genoma de plastos del tabaco. Los componentes del gen *ppo* quimérico de *A. thaliana* son el promotor del gen 16S PEP-NEP rRNA de plastos de maíz fusionado al RBS *rbcL* (PmrrN) de plastos de tabaco, el gen *ppo* de *A. thaliana* (Atppo) y la 3'UTR de *rps16* del plasto *rps16* de *N. tabacum* (3' *rps16*). Los componentes del gen quimérico *aadA* son el promotor *psbA* de *N. tabacum* (PpsbA) fusionado a *aadA*, la secuencia codificante de *aadA* (*aadA*) y la 3'UTR de *psbA* de *A. thaliana* (3' *psbA*). Están marcados los sitios de restricción para **EcoRI, EcoRV, MluI, NcoI, NdeI, NgoMIV, Scal, SnaBI, SpeI, XbaI y XhoI.**

- 55 Figura 4: Ilustra un esquema para integración del transgén PPO en un genoma de plasto. Después de la selección inicial con espectinomicina el vector completo se integra en el genoma del plasto por dos eventos de recombinación posibles que ocurren entre los vectores *rps12* de cloroplastos (1) o secuencias flanqueantes *trnV-rrn16* (2) y el locus direccionado del plasto. Estos eventos de entrecruzamiento simple crean una población mixta de genomas transformados de plastos que tienen el vector insertado en diferente conformación. Subsiguientemente, la selección con butafenacil permite un segundo evento de recombinación entre secuencias repetidas directas que da como resultado la integración estable del gen *ppO* en el genoma del plasto y la escisión completa de *aadA* con la secuencia de la cadena principal del vector. En el presente ejemplo se muestra solamente uno de dos posibles eventos de intrarecombinación. La continuación de la selección con butafenacil permite la selección homoplásmica para genomas de plastos que contienen el gen *ppO*.

- 65 Figura 5: Ejemplos de análisis por hibridación Southern para identificar transformantes de plastos homoplásmicos. A) Polimorfismos de longitud de BamHI esperados entre el locus de transformación de tipo salvaje, los plastos PPO

- transformados y la integración completa del vector después de un evento de recombinación por entrecruzamiento simple entre las secuencias flanqueantes de rps12 (1) o las secuencias flanqueantes de trnV-rn16 (2). B indica la posición de los sitios de restricción con BamHI. B) Panel superior; hibridación Southern de DNA total de tipo salvaje digerido con BamHI (pista wt) y 10 transformantes (pistas marcadas 1 a 10) e hibridado con una sonda específica para el locus de inserción. La secuencia de los plastos de tipo salvaje se observa en 3,2 kb, las líneas homoplásmicas transformadas con PPO (pistas 1-3, 5-7 y 10) se secuencian en 5,0 kb. La línea heteroplásmica (pistas 4 y 9) contiene a la vez el inserto PPO y secuencias de tipo salvaje. Panel inferior; hibridación Southern de DNA total de tipo salvaje digerido con SpeI (pista wt) y 10 transformantes (pistas marcadas 1 a 10) e hibridadas con la sonda específica del gen aadA. El gen aadA (0,9 kb) se observa únicamente en las líneas heteroplásmicas (pistas 4 y 9).
- 5
- 10 Figura 6: Ilustra un esquema para integración del transgén PPO en el genoma de los plastos. Después de selección inicial con espectinomina, los marcadores seleccionables integran el genoma del plasto por tres posibles eventos de entrecruzamiento doble que ocurren entre el vector de transformación de los plastos y el locus del plasto direccionado. Creación de una población mixta de genomas transformados de plastos que tienen uno o ambos marcadores seleccionables. Subsiguientemente, la selección con butafenacil permite la selección homoplásmica para genomas de plastos que contienen gen el PPO y escisión completa de aadA del gen esencial.
- 15

- Figura 7: Mapa del vector de transformación de plastos pEB10. Las secuencias de direccionamiento a los plastos pDNA 16rDNA y rps12/7 se representan por líneas sombreadas. Los componentes del gen quimérico ppo de *A. thaliana* son las secuencias semejantes al promotor del bacteriófago X2 de *Staphylococcus aureus* fusionadas a la 5'UTR del gen 10 del bacteriófago kvp1 (PX2k10), el gen ppo de *A. thaliana* (Atppo) y la 3'UTR del plasto rps16 de *N. tabacum* (3' rps16). Los componentes del gen quimérico aadA y el promotor del plasto clpP de *N. tabacum* (PclpP), la secuencia codificante aadA (aadA) y la 3'UTR rps16 de los plastos de *N. tabacum* (3' rps16). El vector del gen de resistencia a ampicilina (amp) se indica por flechas. Se han marcado los sitios de restricción para PstI, NdeI, EcoRI, EcoRV, BamHI y Scal.
- 20
- 25

Descripción del Listado de Secuencias

SEQ ID NO: 1	Vector de transformación de plastos pEBPPOt (Ejemplo 1 VII).
SEQ ID NO: 2	Vector de transformación de plastos pEB8 (= pEB8a) (Ejemplo 2).
SEQ ID NO: 3	Vector de transformación de plasto pNY2c (Ejemplo 4 II).
SEQ ID NO: 4	Secuencia de DNA del promotor del gen 16S PEP-NEP rRNA de plastos de maíz fusionado al sitio de fijación de ribosoma (RBS) del plasto rbcL de <i>N. tabacum</i> .
SEQ ID NO: 5	Cebador superior para amplificación del promotor del gen 16S PEP-NEP rRNA del DNA de plastos de maíz, comprendiendo el cebador un sitio de restricción EcoRI (Ejemplo 1 I).
SEQ ID NO: 6	Cebador inferior que comprende un sitio de restricción BspHI (Ejemplo 1 I).
SEQ ID NO: 7	Cebador superior para amplificación del gen ppo de <i>A. thaliana</i> (Ejemplo 1 II).
SEQ ID NO: 8	Cebador inferior para amplificación del gen ppo de <i>A. thaliana</i> , comprendiendo el cebador un sitio de restricción SpeI (Ejemplo 1 II).
SEQ ID NO: 9	Cebador de la cadena superior para amplificación del promotor del gen psbA de <i>N. tabacum</i> , comprendiendo el cebador un sitio de restricción EcoRI (Ejemplo 1 III).
SEQ ID NO: 10	Cebador de la cadena inferior para amplificación del promotor del gen psbA de <i>N. tabacum</i> , comprendiendo el cebador un sitio de restricción NcoI (Ejemplo 1 III).
SEQ ID NO: 11	Cebador superior para amplificación del promotor del gen clpP de <i>A. thaliana</i> , comprendiendo el cebador un sitio de restricción EcoRI (Ejemplo 1 V).
SEQ ID NO: 12	Cebador inferior para amplificación del promotor del gen clpP de <i>A. thaliana</i> , comprendiendo el cebador un sitio de restricción BspHI (Ejemplo 1 V).
SEQ ID NO: 13	Cebador superior para amplificación de un nuevo locus diana de DNA de plastos, comprendiendo el cebador un sitio de restricción XhoI (Ejemplo 4 I).
SEQ ID NO: 14	Cebador inferior para amplificación de un nuevo locus diana de DNA de plastos, comprendiendo el cebador un sitio de restricción XbaI (Ejemplo 4 I).
SEQ ID NO: 15	Promotor del bacteriófago X2 de <i>Staphylococcus aureus</i>
SEQ ID NO: 16	5'UTR del gen 10 del bacteriófago kvp1 de <i>Kluyvera</i>
SEQ ID NO: 17	3'UTR del gen 9 del bacteriófago T3
SEQ ID NO: 18	Secuencia de nucleótidos de la secuencia semejante al promotor quimérico del bacteriófago X2 de <i>Staphylococcus aureus</i> fusionada a la 5'UTR del gen 10 del bacteriófago kvp1.
SEQ ID NO: 19	Secuencia de nucleótidos del vector de transformación de plastos pEB10
SEQ ID NO: 20	Cebador de la cadena superior para amplificar el promotor 16S NEP-PEP de maíz (sitio EcoRI).
SEQ ID NO: 21	Cebador de la cadena inferior para amplificar el promotor 16S NEP-PEP de maíz (sitio XbaI).
SEQ ID NO: 22	Cebador de la cadena superior para amplificar la 5'UTR del gen del bacteriófago T3 (RTK36).
SEQ ID NO: 23	Cebador de la cadena inferior para amplificar la 5'UTR del gen del bacteriófago T3 (RTK39).
SEQ ID NO: 24	Cebador de la cadena superior para amplificar 16S NEP-PEP de maíz (sitio SmaI) (RTK38).
SEQ ID NO: 25	Cebador de la cadena inferior para amplificar 16S NEP-PEP de maíz (sitio BspHI)

	(RTK37).
SEQ ID NO: 26	Cadena superior del fragmento EcoRI-XbaI de la secuencia semejante al promotor del bacteriófago X2.
SEQ ID NO: 27	Cadena inferior del fragmento EcoRI-XbaI de la secuencia semejante al promotor del bacteriófago X2.
SEQ ID NO: 28	Cebador de la cadena superior para la 5'UTR del gen 10 de kpv1
SEQ ID NO: 29	Cebador de la cadena inferior para la 5'UTR del gen 10 de kpv1

Definiciones

Para claridad, ciertos términos utilizados en la memoria descriptiva se definen y presentan como sigue:

- 5 "Asociado con/enlazado operativamente" se refieren a dos secuencias de ácido nucleico que están relacionadas física o funcionalmente. Por ejemplo, se dice que una secuencia de DNA promotora o reguladora está "asociada con" una secuencia de DNA que codifica un RNA o una proteína sin las dos secuencias están enlazadas operativamente, o situadas de tal manera que la secuencia de DNA reguladora afectará al nivel de expresión de la secuencia de DNA codificante o estructural.
- 10
- 15 Un "constructo quimérico" o "gen quimérico" es una secuencia de ácido nucleico recombinante en la cual una secuencia de ácido nucleico promotora o reguladora está enlazada operativamente a, o asociada con, una secuencia de ácido nucleico que codifica un mRNA o que se expresa como una proteína, de tal modo que la secuencia reguladora de ácido nucleico es capaz de regular la transcripción o expresión de la secuencia de ácido nucleico asociada. La secuencia de ácido nucleico reguladora del constructo quimérico no está enlazada normalmente de modo operativo a la secuencia de ácido nucleico asociada como se encuentra en la naturaleza.
- 20 Una "secuencia codificante" es una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en RNA tal como mRNA, rRNA, tRNA, snRNA, RNA sentido o RNA antisentido. Preferiblemente, el RNA se traduce luego en un organismo para producir una proteína.
- 25 "Casete de expresión", como se utiliza en esta memoria, significa una molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia particular de nucleótidos en una célula hospedadora o compartimiento de una célula hospedadora apropiado(a), que comprende un promotor enlazado operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés que está enlazada operativamente a señales de terminación. La misma comprende también típicamente secuencias requeridas para traducción apropiada de la secuencia de nucleótidos. La región codificante codifica usualmente una proteína de interés, pero puede codificar también un RNA funcional de interés, por ejemplo RNA antisentido o un RNA no traducido, en la dirección sentido o antisentido. La casete de expresión que comprende la
- 30 secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérica, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. La casete de expresión puede ser también una que existe naturalmente pero se ha obtenido en forma recombinante útil para expresión heteróloga. Típicamente, sin embargo, la casete de expresión es heteróloga con respecto al hospedador, es decir, la secuencia de DNA particular de la casete de expresión no existe naturalmente en la célula hospedadora y tiene que haber sido introducida en la
- 35 célula hospedadora o un ancestro de la célula hospedadora por un evento de transformación. La expresión de la secuencia de nucleótidos en la casete de expresión puede hallarse bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la transcripción únicamente cuando la célula hospedadora se expone a un cierto estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, tal como una planta, el promotor puede ser también específico para un tejido u órgano o etapa de desarrollo particular.
- 40
- 45 Con respecto a la transformación de plastos, la casete de expresión está diseñada de tal manera que el promotor, el terminador y otras secuencias reguladoras son funcionales en los plastos. El término "gen" se utiliza en sentido amplio para hacer referencia a cualquier segmento de DNA asociado con una función biológica. Así, los genes incluyen secuencias codificantes y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Los genes incluyen también segmentos de DNA no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Los genes pueden obtenerse de una diversidad de fuentes, que incluyen clonación a partir de una fuente de interés o síntesis a partir de información de secuencia conocida o predicha, y pueden incluir secuencias diseñadas que tienen parámetros deseados.
- 50 Los términos "heterólogo" y "exógeno" cuando se utilizan en esta memoria para hacer referencia a una secuencia de ácido nucleico (v.g., una secuencia de DNA) o un gen, se refieren a una secuencia que se origina a partir de una fuente extraña a la célula hospedadora particular o, si proceden de la misma fuente, está modificada con respecto a su forma original. Así, un gen heterólogo en una célula hospedadora incluye un gen que es endógeno para la célula hospedadora particular, pero que se ha modificado, por ejemplo, por el uso de desordenamiento del DNA. Los
- 55 términos incluyen también copias múltiples no existentes naturalmente de una secuencia de DNA existente naturalmente. Así, los términos se refieren a un segmento de DNA que es extraño o heterólogo a la célula, u homólogo a la célula pero que se encuentra en una posición en el ácido nucleico de la célula hospedadora en la cual no se encuentra ordinariamente el elemento. Los segmentos exógenos de DNA se expresan para producir polipéptidos exógenos. Una secuencia de ácido nucleico (v.g., DNA) "homóloga" es una secuencia de ácido nucleico (v.g. DNA) asociada
- 60 naturalmente con una célula hospedadora en la cual se introduce la misma.

- "Homoplásmico" se refiere a plastos, células de plantas y plantas que comprenden un solo tipo, uniforme, de copias del plastoma, es decir se refiere a plastos que no comprenden copias de plastomas diferentes o a células de plantas o plantas que no comprenden poblaciones de plastos mixtas. En el contexto de la presente invención, una molécula de DNA o enzima "aislada" es una molécula de DNA o enzima que, por acción humana, existe aparte de su ambiente natural y por consiguiente no es un producto de la naturaleza. Una molécula de DNA o enzima aislada puede existir en forma purificada o puede existir en un ambiente no natural tal como, por ejemplo, en una célula hospedadora transgénica.
- 5
- 10 "Enlazado con" se refiere a una primera secuencia de ácido nucleico que está enlazada con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando las secuencias están dispuestas de tal modo que la primera secuencia de ácido nucleico afecta a la función de la segunda secuencia de ácido nucleico. Preferiblemente, las dos secuencias forman parte de una sola molécula contigua de ácido nucleico y más preferiblemente son adyacentes. Por ejemplo, un promotor está enlazado operativamente a un ácido nucleico que codifica una proteína si el promotor regula o media la transcripción de la secuencia codificante en una célula. El término "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono- o bi-catenaria. A no ser que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de ligación similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos existentes naturalmente. A no ser que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular abarca también implícitamente variantes de la misma modificadas de manera conservadora (v.g. sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias así como la secuencia indicada explícitamente. De manera específica, las sustituciones de codones degenerados pueden realizarse por generación de secuencias en las cuales la tercera posición de uno o más (o todos) los codones seleccionados está sustituida con residuos de base mixta y/o residuos desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260: 2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98 (1994)). Los términos "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" pueden utilizarse intercambiamente con gen, cDNA, y mRNA codificado por un gen.
- 15
- 20
- 25

"ORF" significa marco de lectura abierto.

- 30 "Compuesto letal para los plastos" se refiere a cualquier compuesto que afecta a la viabilidad de un plasto de célula vegetal de tipo salvaje. Los compuestos que afectan a la viabilidad de un plasto de célula vegetal de tipo salvaje incluyen, pero sin carácter limitante, compuestos que degradan rápidamente las membranas de los plastos, inhiben los caminos metabólicos de los plastos (tales como la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, la fotosíntesis, la biosíntesis de clorofila, la asimilación de amonio, etc.), compuestos tóxicos, proteasas, nucleasas, compuestos que alteran el pH de la célula, etc. Preferiblemente, el compuesto letal para los plastos degrada las membranas interna y externa de un plasto de célula vegetal de tipo salvaje. Ejemplos de tales compuestos incluyen cualquier herbicida, que incluye pero sin carácter limitante, glifosato, butafenacil, fosfoinotricina, norfluorazona, atrizina, glufosinato, bromoxinil, y acifluorfenol.
- 35
- 40 Un experto en la técnica reconocerá que la capacidad de los compuestos letales para los plastos de afectar a la viabilidad de los plastos depende de la concentración del compuesto en el medio, la duración de exposición, y el tipo y/o fuente del tejido vegetal.
- "Compuesto no letal para los plastos" se refiere a compuestos que afectan al metabolismo del plasto de la célula vegetal y por consiguiente ralentizan o inhiben el crecimiento del plasto o de la célula como un todo, pero no afectan a la viabilidad del plasto o de la célula vegetal durante la fase inicial.
- 45
- "Transformación de plastos" se refiere a la transformación genética de una célula vegetal o planta en la cual se suministran secuencias de DNA extraño a los plastos y se integran en el genoma del plasto (plastoma).
- 50
- Dos ácidos nucleicos están "recombinados" cuando las secuencias de cada uno de los dos ácidos nucleicos se combinan en un ácido nucleico de la progenie. Dos secuencias están "recombinadas directamente" cuando ambos ácidos nucleicos son sustratos para recombinación. Dos secuencias están "recombinadas indirectamente" cuando las secuencias se recombinan utilizando un intermediario tal como un oligonucleótido cruzado. Para recombinación indirecta, no más de una de las secuencias es un sustrato real para la recombinación, y en algunos casos, ninguna de las secuencias es un sustrato para la recombinación.
- 55
- "Elementos reguladores" se refieren a secuencias implicadas en el control de la expresión de una secuencia de nucleótidos. Los elementos reguladores comprenden un promotor enlazado operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés y las señales de terminación. Los mismos abarcan también típicamente secuencias requeridas para traducción apropiada de la secuencia de nucleótidos.
- 60
- "Transformación" es un proceso para introducir DNA heterólogo en una célula de planta, tejido de planta, o planta. Debe entenderse que las células de planta, tejido de planta, o plantas transformadas abarcan no sólo el producto final de un proceso de transformación, sino también la progenie transgénica del mismo.
- 65

- "Transformado", "transgénico", y "recombinante" hacen referencia a un organismo hospedador tal como una bacteria o una planta en la cual se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. La molécula de ácido nucleico puede estar integrada de manera estable en el genoma del hospedador, o la molécula de ácido nucleico puede estar presente también como una molécula extracromosómica. Una molécula extracromosómica de este tipo puede ser auto-replicante. Se entenderá que las células, tejidos o plantas transformados(as) abarcan no sólo el producto final de un proceso de transformación, sino también la progenie transgénica del mismo. Un hospedador "no transformado", "no transgénico" o "no recombinante" hace referencia a un organismo de tipo salvaje, v.g., una bacteria o una planta, que no contiene la molécula de ácido nucleico heteróloga.
- 10 "Transplastómico" se refiere a plastos, células de plantas y plantas que comprenden plastomas transformados.
- Descripción Detallada de la Invención
- 15 Transformación de plastos con integración estable de un marcador letal seleccionable e integración transitoria de un marcador seleccionable no letal
- La presente invención proporciona métodos para producir plantas transgénicas que tienen genomas de plastos recombinantes sin la integración estable de un marcador de resistencia a los antibióticos.
- 20 Un aspecto de la presente invención proporciona vectores de transformación de plastos útiles para obtener plastos transformados. Los vectores comprenden una secuencia de ácido nucleico marcadora seleccionable quimérica letal que codifica una proteína que proporciona tolerancia a un compuesto letal para la célula y una secuencia de ácido nucleico marcadora seleccionable quimérica no letal que codifica una proteína que proporciona resistencia a un compuesto selectivo no letal para el plasto. En un vector de acuerdo con la invención, la secuencia de ácido nucleico marcadora letal seleccionable está flanqueada por secuencias de direccionamiento del plasto, mientras que la secuencia de ácido nucleico marcadora seleccionable no letal está localizada en la cadena principal del vector fuera de las secuencias de direccionamiento del plasto.
- 25 La secuencia de ácido nucleico marcadora seleccionable quimérica letal comprende una secuencia promotora funcional en el plasto, una región reguladora 5' no traducida (5'UTR), una secuencia de DNA que codifica una proteína que confiere tolerancia al compuesto letal para la célula y una región 3' no traducida (3'UTR).
- 30 La secuencia de ácido nucleico marcadora seleccionable quimérica no letal comprende una secuencia promotora funcional en el plasto, una 5'UTR reguladora, una secuencia de DNA que codifica un marcador seleccionable no letal que codifica una proteína que confiere resistencia a un compuesto no letal para los plastos, y una 3'UTR.
- 35 Otro aspecto de la presente invención proporciona vectores de transformación de plastos útiles para obtener plastos transformados e integrar secuencias de DNA en el genoma del plasto. Tales secuencias de DNA pueden ser, por ejemplo, genes, secuencias o moléculas de ácido nucleico quiméricas, o casetes de expresión para la expresión de un producto génico o productos génicos en los plastos transformados. Estos vectores de transformación de plastos contienen además de las características descritas previamente al menos una secuencia de DNA de este tipo que está enlazada a la secuencia de ácido nucleico marcadora seleccionable quimérica letal en las secuencias de direccionamiento de los plastos. Una secuencia de DNA expresable comprende típicamente una secuencia promotora funcional en el plasto, una 5'UTR reguladora, al menos un segmento de DNA que codifica un producto génico de interés y una 3'UTR. Alternativamente, la secuencia de DNA que codifica uno o varios productos génicos y el marcador seleccionable quimérico letal puede ser expresada por un promotor simple en un gen policistrónico semejante a un operón.
- 40 Numerosos métodos conocidos por los expertos en la técnica se utilizan en la producción de los constructos y vectores de la presente invención tales como, pero sin carácter limitante, ligación, digestión con enzimas de restricción, reacción en cadena de polimerasa (PCR), mutagénesis in vitro, adiciones de enlazadores y adaptadores, etc, y se describen por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (1989). Por tanto, pueden realizarse transiciones, transversiones, inserciones, y deleciones de nucleótidos en moléculas de ácido nucleico que se emplean en las regiones reguladoras, las secuencias de ácido nucleico de interés para expresión en los plastos.
- 45 La presente invención proporciona también métodos para transformación de plastos que utilizan un protocolo de selección de dos pasos con compuestos no letales para los plastos y compuestos letales para la célula. Los transformantes iniciales de los plastos se seleccionan en un medio que contiene un compuesto no letal para los plastos. La selección se facilita por la expresión de un gen marcador seleccionable no letal integrado transitoriamente en el genoma del plasto. Una vez que se ha acumulado un número suficiente de plastos transformados por célula, el medio del compuesto no letal se reemplaza por un medio que contiene un compuesto letal para la célula que selecciona los genomas de los plastos que expresan la proteína que confiere tolerancia a este compuesto.
- 50 Alternativamente, se seleccionan transformantes iniciales en un medio que contiene a la vez un compuesto no letal para los plastos y un compuesto letal para la célula. Una vez que se ha acumulado un número suficiente de plastos
- 55

transformados por célula, se continúa la selección en un medio que contiene únicamente el compuesto letal para la célula.

5 En una realización preferida de la invención, el compuesto no letal para los plastos es un antibiótico y el marcador no letal es un gen de resistencia a antibióticos.

En otra realización preferida, el compuesto letal para la célula es un herbicida, preferentemente un herbicida del grupo de los inhibidores de PPO.

10 Transformación de plastos con integración estable de *ppo* e integración transitoria de *aadA*

15 En una realización preferida de la presente invención, el gen marcador letal seleccionable es una protoporfirinógeno-oxidasa (*ppo*) que confiere tolerancia al compuesto letal para la célula butafenacil, y el gen marcador seleccionable no letal es aminoglicosido-adeniltransferasa (*aadA*) que confiere resistencia al compuesto no letal para los plastos espectinomícina.

20 La presente invención proporciona un método para producir una planta transgénica que posee genomas de plastos recombinantes sin integración estable de un marcador seleccionable de antibióticos tal como *aadA*. Los transformantes iniciales de los plastos se seleccionan en medio que contiene espectinomícina basado en la expresión del gen *aadA* que está integrado transitoriamente en el genoma del plasto. Una vez que se ha acumulado un número suficiente de plastos transformados por célula, se confiere a la célula tolerancia a butafenacil por la expresión del gen *ppo* que está integrado de manera estable en el plastoma. La eliminación del gen resistente al antibiótico y la segregación y selección de transformantes homoplásmicos se realiza por cambio de selección con espectinomícina a butafenacil.

25 Es útil también un método para integrar establemente un transgén o transgenes de interés en el genoma de los plastos por direccionamiento del mismo a una región no esencial del genoma del plasto en donde el marcador seleccionable está insertado de manera inestable en el genoma del plasto por direccionamiento del mismo al genoma del plasto de tal manera que altera un gen esencial del plasto. Este método está basado en el hecho de que la interrupción direccionada de genes esenciales de los plastos es inestable debido a que los genes interrumpidos revierten a su conformación de tipo salvaje cuando se elimina la presión selectiva. Los genomas de los plastos poseen varios genes (tales como *ycf1*, *ycf2* y *clpP*) que son esenciales para la supervivencia de la célula. Los intentos previos para desactivar tales genes por interrupción direccionada con genes marcadores seleccionables (Shikanai et al., *Plant Cell Physiol.* 42:264-73, 2001; Drescher et al., *Plant J.* 22:97-104, 2000; Boudreau et al., *Mol. Gen. Genet.* 253:649-53, 1997; Huang et al., *Mol. Gen. Genet.* 244:151-9, 1994) pudieron producir únicamente poblaciones heteroplásmicas de plastos que comprendían a la vez los genes interrumpidos y los de tipo salvaje. La inserción del marcador seleccionable en estos genes es inestable y la eliminación de la presión selectiva da como resultado la pérdida del marcador selectivo y la reversión a poblaciones de plastos homoplásmicas que tienen únicamente copias de tipo salvaje del gen esencial (Drescher et al., *Plant J.* 22: 97-104, 2000; Fischer et al., *Mol. Gen. Genet.* 251: 373-80, 1996).

45 Se describen también vectores de transformación de plastos útiles para la obtención de plastos transformados. El vector de transformación de plastos comprende un segmento de DNA homólogo a un locus del plasto que contiene al menos una parte de una secuencia del gen esencial del plasto y una secuencia adyacente no esencial del plasto, tal como una región intergénica. Los vectores comprenden un gen marcador seleccionable quimérico no letal, que codifica una proteína que proporciona resistencia a un compuesto no letal para los plastos, en donde el gen marcador seleccionable no letal está insertado en la secuencia del gen esencial del plasto. El vector comprende adicionalmente un gen marcador quimérico letal seleccionable, que codifica una proteína que proporciona tolerancia a un compuesto letal para la célula, en donde el gen marcador letal seleccionable está insertado en la secuencia del plasto no esencial de la secuencia. El gen marcador quimérico letal seleccionable comprende una secuencia promotora funcional en el plasto, una 5'UTR reguladora, una secuencia de DNA que codifica una proteína que confiere tolerancia a un compuesto letal para la célula, y una 3'UTR del plasto.

55 El gen marcador seleccionable quimérico no letal comprende una secuencia promotora funcional en el plasto, una 5'UTR reguladora, una secuencia de DNA que codifica una proteína que confiere resistencia a un compuesto no letal para los plastos, y una 3'UTR. Ambas casetes marcadoras seleccionables letal y no letal están flanqueadas por una secuencia de DNA del plasto para inserción direccionada en el genoma del plasto por recombinación homóloga. La secuencia de DNA del plasto que enlaza los genes a insertar tiene que ser de longitud suficiente para permitir la recombinación de ambos genes enlazados y no enlazados con el genoma del plasto. Preferentemente, tales secuencias de DNA enlazadoras del plasto tienen una longitud de al menos 200 pb.

65 Otro aspecto de la presente invención proporciona vectores de transformación de plastos útiles para la obtención de plastos transformados y para la expresión de uno o más productos génicos en los plastos transformados. Los vectores de transformación de plastos comprenden además de los segmentos previamente descritos de direccionamiento de los plastos con genes marcadores seleccionables, al menos una secuencia de DNA expresable que está enlazada al gen marcador seleccionable quimérico letal en la secuencia no esencial. La secuencia de DNA expresable

comprende una secuencia promotora funcional en el plasto, una 5'UTR reguladora, un segmento de DNA que codifica un producto génico y una 3'UTR plastídica.

5 Alternativamente, la secuencia de DNA que codifica uno o varios productos génicos y el marcador seleccionable quimérico letal se expresan a partir de un promotor simple en un gen policistrónico semejante a un operón.

La presente invención proporciona también métodos para transformación de plastos que utilizan un protocolo de selección en dos pasos con compuestos no letales para el plasto y letales para la célula. Los transformantes cebadores de los plastos se seleccionan en un medio que contiene un compuesto no letal para los plastos. La selección se facilita por la expresión de un gen marcador seleccionable no letal integrado en el gen esencial del plasto direccionado. Una vez que se ha acumulado un número suficiente de plastos transformados por célula, se reemplaza el medio del compuesto no letal por un medio que contiene un compuesto letal para la célula que selecciona los genomas del plasto que expresan la proteína que confiere tolerancia a este compuesto. Después de varias tandas de subcultivo del tejido en medios selectivos letales, los genomas de los plastos se vuelven homoplásmicos para el gen marcador letal seleccionable o el marcador letal seleccionable con una o más secuencias de DNA expresables, y de tipo salvaje para el gen esencial direccionado.

20 Alternativamente, se seleccionan transformantes iniciales en un medio que contiene a la vez un compuesto no letal para los plastos y un compuesto letal para la célula. Una vez que se ha acumulado un número suficiente de plastos transformados por célula, se continúa la selección en un medio que contiene únicamente un compuesto letal para la célula.

Transformación de plastos con integración estable de *ppo* e integración inestable de *aadA*

25 En una realización preferida de la presente invención, el gen marcador letal seleccionable es protoporfirinogenoxidasa (*ppo*) que confiere tolerancia al compuesto letal para la célula butafenacil, y el gen marcador seleccionable no letal es aminoglicosido-adeniltransferasa (*aadA*) que confiere resistencia al compuesto no letal para el plasto espectinomocina.

30 Se describe también un método para producir una planta transgénica que tiene genomas de plasto recombinantes sin integración estable de un marcador antibiótico seleccionable tal como *aadA*. Se seleccionan transformantes iniciales de plastos en medio que contiene espectinomocina basado en la expresión del gen *aadA* que está integrado de manera inestable en el genoma del plasto, interrumpiendo un gen esencial del plasto. Una vez que se ha acumulado un número suficiente de plastos transformados por célula, se confiere a la célula tolerancia a butafenacil por la expresión del gen *ppo* que está integrado de manera estable en el plastoma. La reversión del gen esencial del plasto interrumpido al gen de tipo salvaje y la segregación y selección de transformantes homoplásmicos se realizan por cambio de selección con espectinomocina a butafenacil.

Sección II: Métodos para selección de plantas homoplásmicas transplastómicas que expresan el gen *ppo* en sus plastos

40 La invención se refiere a métodos para selección de células de plantas homoplásmicas o plantas que comprenden plastos transplastómicos que tienen el gen *ppo* integrado en su plastoma con la exclusión de cualquier gen de resistencia a antibióticos.

45 Estos métodos emplean una casete de expresión de plastos *ppo*, que está flanqueada por una secuencia homóloga al DNA de plastos, una casete de expresión de plastos *aadA*, que está separada de la secuencia flanqueante de la casete *ppo*, y una cualquiera de las dos estrategias de selección de fase proporcionadas por la invención, que comprenden utilizar el gen *ppo* como gen marcador seleccionable durante la fase de segregación de poblaciones de plastos heteroplásmicas y la selección de células vegetales homoplásmicas para obtener plantas transplastómicas que tienen el gen *ppo* integrado en su plastoma con la exclusión del gen de resistencia a los antibióticos *aadA*.

50 Un aspecto adicional de la invención se refiere a la extensión de métodos de transformación de plastos a material vegetal no pigmentado. La invención proporciona estrategias de selección que comprenden utilizar un gen marcador letal seleccionable para transformación de plastos y un compuesto letal para la célula tal como Fórmula XVII como agente selectivo, en donde la pigmentación verde no es esencial para el fenotipo transplastómico seleccionado. Estas estrategias de selección tienen por consiguiente el potencial de ser aplicadas tanto a tejido verde como a tejido no verde para transformación de plastos.

55 El gen marcador letal seleccionable *ppo* y el gen de resistencia a los antibióticos *aadA* se suministran conjuntamente a las dianas de transformación en los mismos constructos, en donde la casete *ppo* comprende su propia secuencia flanqueante que es homóloga a un fragmento de DNA plastídico, mientras que la casete *aadA* está separada de la secuencia flanqueante de la casete *ppo*. La casete *ppo* comprende un promotor 5', el gen *ppo*, y una 3'UTR, diseñada para expresión en el plasto, mientras que la casete *aadA* comprende un promotor 5', el gen *aadA* y una 3'UTR, diseñada para expresión en el plasto.

El procedimiento de selección se compone de dos fases. Durante la primera fase de la selección, se seleccionan células que contienen plastos transplastómicos en un medio que comprende el compuesto selectivo no letal espectinomycinina o estreptomycinina. Alternativamente, el medio de selección utilizado durante la primera fase de selección comprende espectinomycinina o estreptomycinina en combinación con el herbicida Fórmula XVII como un agente selectivo letal para la célula.

5

La selección de la primera fase en un medio que contiene el compuesto no letal se lleva a cabo durante un periodo de tiempo en el cual los eventos resistentes no son visualmente detectables todavía. Una persona experta en la técnica conocerá el modo de determinar este periodo de tiempo, basándose v.g., en parámetros de cultivo de tejidos que son específicos para la especie de planta a transformar. La primera fase de selección dura desde aproximadamente 5 días a aproximadamente 8 semanas, de modo más específico durante aproximadamente una semana a aproximadamente 6 semanas. Preferentemente, la primera fase de selección tiene una duración aproximada 2 a 4 semanas.

10

Alternativamente, la primera fase de selección puede extenderse hasta que los eventos resistentes se hacen visualmente detectables. Dependiendo de la especie de planta a transformar y del tipo de explante utilizado, los eventos resistentes llegan a hacerse visibles al cabo de aproximadamente una semana hasta aproximadamente 15 semanas, de modo más específico después de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 semanas. Cuando la primera fase de selección se extiende hasta que los eventos resistentes son visualmente detectables, la primera fase de selección tiene como valor típico una duración de aproximadamente 5 semanas.

15

20

La segunda fase de selección que sigue a la selección inicial sobre espectinomycinina se lleva a cabo en un medio que contiene el agente letal para la célula Fórmula XVII como agente selectivo. El proceso de segregación y selección durante esta fase da como resultado la pérdida rápida del gen de resistencia a antibióticos *aadA* y el establecimiento de una población homoplásmica de plastos que tiene el gen *ppo* integrado de manera estable en el plastoma. Las células transplastómicas así obtenidas se regeneran luego en plantas homoplásmicas que expresan gen *ppo* en sus plastos y que transmiten los plastos transplastómicos a su progenie. Las plantas homoplásmicas que contienen el transplastoma PPO dan como resultado una tolerancia a los herbicidas mucho mayor que las plantas nucleares transformadas con el mismo gen. Adicionalmente, se obtiene una resistencia a los herbicidas mucho mayor con las plantas transplastómicas homoplásmicas que expresan en el *ppo* en sus plastos que con los transformantes nucleares que expresan *ppo* en el núcleo.

25

30

En la presente invención puede emplearse cualquier método conocido para transformación de plastos en células vegetales disponible que dé como resultado células de plantas que contengan una población de plastos en los cuales se ha introducido un constructo de ácido nucleico recombinante que tiene una secuencia de DNA que codifica una proteína que proporciona tolerancia a un compuesto letal para los plastos o un compuesto no letal para los plastos según los casos. Métodos de transformación de plastos incluyen, pero sin carácter limitante, bombardeo con partículas, y transformación mediada por PEG.

35

La transformación estable de genomas de plastos de tabaco por bombardeo con partículas ha sido publicada (Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab y Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917) y la transformación de plastos mediada por PEG ha sido descrita por Koffer et al. (1998) in Vitro Cell. Biol. Plant, 34: 303-309. Otros métodos para introducir constructos recombinantes en plastos de células vegetales se conocen en la técnica, y se describen por ejemplo en Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8526-8530, Sikdar et al. (1998) Plant Cell Reports 18: 20-24, publicación PCT WO 97/2977, y Sidorov et al. (1999) Plant J. 19(2): 209-216. Métodos adicionales para introducir dos constructos en un plasto de célula vegetal se describen por ejemplo en Carrer et al. Biotechnology 13: 791-794 (1995). Los métodos descritos en las referencias anteriores pueden emplearse para obtener células de plantas transformadas con los constructos de transformación de plastos descritos en esta memoria.

40

45

50

La regeneración de plantas enteras a partir de una célula transformada contenida en el tejido utilizado en la transformación implica varias etapas de crecimiento. Típicamente, un tejido, que ha sido escindido de una planta adulta o planta joven germinada, se pone en un medio químicamente definido en condiciones estériles. Por cultivo del explante en tales condiciones controladas durante cierto periodo de tiempo, puede formarse una masa indiferenciada de células, a la que se hace referencia como un callo. Por cultivo de este callo en la serie de condiciones apropiada, v.g. nutrientes, luz, temperatura, humedad, y proporcionando la combinación y concentración apropiada de reguladores del crecimiento de las plantas, los callos pueden ser inducidos a formar células diferenciadas y regenerar brotes de plantas. Los brotes de plantas, a los que se hace referencia a veces como plántulas, que contienen tejido de meristemo, se transfieren luego a un medio para la inducción de la producción de raíces.

55

60

Los medios selectivos utilizados y descritos en esta memoria pueden ser líquidos o sólidos, tales como la adición de un agente solidificante, tal como agar. Un medio selectivo líquido permite una mayor área superficial de contacto del tejido de la planta con el medio selectivo que contiene hormonas particulares, agentes selectivos particulares y otras sustancias necesarias para obtener la regeneración.

65

Las realizaciones arriba descritas son ilustrativas. Esta descripción de la invención colocará a un experto en la técnica en posesión de muchas variaciones de la invención. La totalidad de dichas variaciones obvias y previsibles deben considerarse abarcadas por las reivindicaciones adjuntas.

5 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación del vector de transformación de plastos para integración transitoria de *aadA*.

10 I. Amplificación del promotor del gen 16S PEP-NEP rRNA de plastos de maíz fusionado al sitio de fijación de ribosoma (RBS) de plastos *rbcl* de *N. tabacum*

El promotor del gen 16S PRP-NEP rRNA del maíz (genoma de cloroplastos completo de *Zea mays*, número de acceso X86563, posición 94966 a 95115) se aisló por amplificación PCR a partir de DNA 6N615 de maíz utilizando un cebador de la cadena superior que comprendía un sitio de restricción EcoRI introducido en el extremo 5' de la región promotora del gen 16S rRNA (SEQ ID NO: 5; 5'-GCCAGAATTCACCACGATCGAACGGGAATGGATA-3', el sitio EcoRI está subrayado) y un cebador de la cadena inferior que se extiende hasta el promotor del gen rRNA 16S, muta un ATG aguas abajo del sitio de comienzo de la transcripción por cambio de posición (T a G), fusiona el RBS *rbcl* del tabaco (genoma de cloroplastos completo de *N. tabacum*, número de acceso NC_001879, posición 577569 a 57585) como una extensión 5' hasta el extremo 3' de la 5'UTR del gen rRNA 16S e introduce un sitio BspHI en el extremo 5' del RBS (SEQ ID NO: 6; 5'-
 15 GCCGTCATGAATCCCTCCCTACAACCTGATTCCGGAATTGTCTTTCCTTCCAAGGATAACTTGTATCCAG
 GCGCTTCAG-3', el sitio de restricción BspHI está subrayado). La amplificación PCR se llevó a cabo con el kit de DNA-polimerasa Pfu Turbo (Stratagene, LaJolla, CA) en un Termociclador Perkin Elmer 480 de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Perkin Elmer/Roche, Branchburg, NJ) como sigue: 5 min 95°C, seguido por 5 ciclos
 20 de 1 min 95°C/2 min 49°C/1 min 72°C, y después 25 ciclos de 1 min 95°C, 2 min 55°C/1 min 72°C.

La secuencia de DNA del promotor del gen 16S PEP-NEP rRNA de plastos del maíz fusionada al sitio de fijación de ribosoma (RBS) del plasto *rbcl* de *N. tabacum* se proporciona en SEQ ID NO: 4. En la representación de SEQ ID NO: 4 siguiente la secuencia promotora del gen rRNA 16S está subrayada; el nucleótido mutado se indica en negra; el codón de iniciación (ATG) se indica en versalitas:

30
 1 GAATTCACCA CGATCGAACG GGAATGGATA AGAGGCTTGT GGGATTGACG
 50 TGATAGGGTA GGGTTGGCTA TACTGCTGGT GGCGAACTCC AGGCTAATAA
 100 TCTGAAGCGC CTGGATACAA GTTATCCTTG GAAGGAAAGA CAATCCGAA
 150 TCAGTTGTAG GGAGGGATTC atg

35 II. Construcción de un promotor rRNA 16S de maíz fusionado al sitio de fijación de ribosoma (RBS) del gen *rbcl* de *N. tabacum*, el gen *ppo* de *Arabidopsis thaliana* y la casete 3'UTR *rps16* de plastos de *N. tabacum* para selección de plastos.

Se creó el gen quimérico *ppo* de *A. thaliana* por los pasos de clonación siguientes. El plásmido pAT259 que contenía la secuencia codificante *ppo* de *Arabidopsis* se creó por ligación de una parte de 450 pb que comprendía EcoRI-SfuI del gen *ppo* de *Arabidopsis* que contiene las mutaciones puntuales pAraC-2Met y pAra305 Leu (descrita en US 6.084.155) a un fragmento de 4,1 kb EcoRI-SfuI de pPH141 (descrito también en US 6.084.155). Se añadió un sitio de restricción SpeI en el extremo 3' del gen *ppo* por amplificación PCR utilizando pAT259 como molde de DNA y el cebador siguiente de la cadena superior (SEQ ID NO: 7; 5'-CCACGCACGCAAGGAGTTGA-3') y el cebador de la cadena inferior (SEQ ID NO: 8; 5'-CGGTACTAGTCTGGGAGATTTAATGTT-3', el sitio de restricción SpeI está subrayado).

45 Se formó el plásmido pAT260 por ligación del vector pLITMUS28 de 2,8 pb digerido con NcoI-SpeI con un fragmento de 1,1 kb NcoI-EcoRI de pAT259 que contenía el extremo 5' de la secuencia codificante de *ppo* y un fragmento amplificado por PCR de 337 pb EcoRI-SpeI que contenía el extremo 3' del gen *ppo*.

Se obtuvo el plásmido pAT263 por ligación de un fragmento de 1,5 kb NcoI-SpeI de pAT260 que comprendía la secuencia codificante *ppo* de *Arabidopsis* con un fragmento de 2,8 kb EcoRI-SpeI de pAT229 (descrito en WO 00/20612) que comprendía la 3'UTR de plastos de tabaco *rps16* integrada en el vector pUC19 (New England Biolabs) y la secuencia promotora de 145 pb EcoRI-NcoI del maíz rRNA 16S PEP-NEP-*rbcl* (RBS) amplificada por PCR.

55 III. Amplificación y clonación del promotor *psbA* de plastos de *N. tabacum*

El promotor del gen *psbA* del tabaco (genoma de cloroplastos completo de *N. tabacum*, número de acceso NC_001879, posición 1596 a 1745) se aisló por amplificación PCR de DNA aislado de la variedad cultivada de *N. tabacum* 'Xanthi' utilizando un cebador de la cadena superior que comprendía un sitio de restricción EcoRI introducido en el extremo 5' de la región promotora del gen *psbA* (SEQ ID NO: 9; 5'-TTAAGAATTCGAATAGATCTACATA-3', el sitio EcoRI está subrayado) y un cebador de la cadena inferior que comprendía un sitio NcoI introducido en el extremo de la 5'UTR *psbA* (SEQ ID NO: 10; 5'-CAGCCATGGTAAAATCTTGTT-3', el sitio de restricción NcoI está

subrayado). La amplificación por PCR se realizó con el kit de DNA-polimerasa Pfu Turbo (Stratagene, LaJolla CA) en un Termociclador 480 Perkin Elmer de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Perkin Elmer/Roche, Branchburg, NJ) como sigue: 1 min 94°C, seguido por 35 ciclos de 1 min 94°C/1 min 45°C/1 min 72°C, y después 10 min a 72°C. El producto de amplificación de 161 pb predicho se digirió con EcoRI y NcoI y se ligó en los sitios de

5 respectivos de pLITMUS28 (New England Biolabs, Beverly, MA) para formar el plásmido pPB30.

IV. Preparación del gen quimérico que contenía el promotor *psbA* de *N. tabacum* fusionado a *aadA*.

10 El plásmido pPB37 que comprendía el promotor *psbA* de tabaco aguas arriba de la secuencia codificante *aadA*, un gen bacteriano codificante de la enzima aminoglicosido-adeniltransferasa que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomina, se obtuvo por ligación del vector pLITMUS28 de 2,8 kb digerido con EcoRI-SpeI con el fragmento promotor de 149 pb EcoRI-NcoI *psbA* de tabaco de pPB30 y un fragmento de 813 pb BspHI-SpeI de pAT229 que contiene la secuencia codificante *aadA*.

15 V. Construcción de un gen quimérico que contiene el promotor *clpP* de *Arabidopsis thaliana* fusionado a un gen informador *gus* y la 3'UTR *psbA* de plastos de *A. thaliana*.

20 El plásmido pAT242 que comprendía un gen quimérico *gus* se obtuvo por la estrategia de clonación siguiente. El promotor *clpP* de *A. thaliana* se amplificó por PCR del plásmido pPH146b (descrito en US 6.362.398) utilizando un cebador de la cadena superior que comprendía un sitio de restricción EcoRI introducido en el extremo 5' de la región promotora del gen *clpP* (SEQ ID NO: 11; 5'-GCGGAATTCATCATTGAGAAGCCCGTTCGT-3', el sitio EcoRI está subrayado) y un cebador de la cadena inferior que comprendía un sitio BspHI introducido en el extremo 5' de la 5'UTR *clpP* (SEQ ID NO: 12; 5'-GCGTCATGAAATGAAAGAAAAAGAGAAT-3', el sitio BspHI está subrayado). La amplificación por PCR del fragmento de 250 pb se realizó con el kit de DNA-polimerasa Pfu Turbo (Stratagene, LaJolla, CA) en un Termociclador 480 Perkin Elmer de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Perkin Elmer/Roche, Branchburg, NJ) como sigue: 1 min 94°C, seguido por 35 ciclos de 1 min 94°C/1 min 45°C/1 min 72°C, y después 10 min 72°C. Se creó pAT242 por ligación del fragmento de 238 pb EcoRI-BspHI de la amplificación PCR del promotor *clpP* de *A. thaliana* a un fragmento de 2,1 kb NcoI-HindIII de pAT221 que contenía el gen *gus* enlazado a la 3'UTR *psbA* de plastos de *A. thaliana* (descrita en WO 00/20612) y al vector pUC21 de 3,2 kb digerido con HindIII-EcoRI.

30

VI. Inserción de los genes quiméricos *ppo* y *aadA* en un vector de transformación de plastos de tabaco.

35 Se creó el plásmido pPB2 que tenía los genes quiméricos *ppo* y *gus* clonados en orientación opuesta por ligación de un fragmento de 1,8 kb HindIII-EcoRI de pAT263, que se cortó totalmente con HindIII pero cortado sólo parcialmente con EcoRI, que contenía el gen quimérico de maíz rRNA 16S PEP-NEP-rbcl (RBS)::*ppo*::*N. tabacum* *rps16* 3'UTR, un fragmento de 2,3 kb EcoRI-PstI que contenía el gen quimérico *A. thaliana* *clpP* promotor::*gus*::*A. thaliana* *psbA* 3'UTR del plásmido pAT242 y el vector de 2,9 kb Bluescript SK+ de 2,9 kb digerido con HindIII-PstI (Stratagene, LaJolla, CA). Se obtuvo el vector de transformación de plastos pPB6 flanqueando los genes quiméricos *ppo* y *gus* con la secuencia de cloroplastos de tabaco. Un fragmento de 4,1 kb PstI que comprendía ambos genes quiméricos de pPB2 se ligó al plásmido pAT218 linealizado con PstI (PCT WO 00/20612) que contenía la secuencia de direccionamiento de plastos. Se obtuvo el vector de transformación de plastos pPB97 por reemplazamiento de la secuencia codificante *gus* pPB6 con el promotor *clpP* de *A. thaliana* por la casete *N. tabacum* *psbA* promotor::gen *aadA* del plásmido pPB37. Un fragmento de 962 pb EcoRI-SpeI de un plásmido pPB37 digerido totalmente con EcoRI pero parcialmente con SpeI se ligó a un fragmento de 6,7 kb EcoRI-XbaI de un plásmido pPB6 digerido totalmente con XbaI pero parcialmente con EcoRI.

45

VII. Creación del vector de transformación de plastos pEBPPOt.

50 Se creó el vector de transformación de plastos de pEBPPOt (SEQ ID NO: 1) para integración estable del gen *ppo* de *A. thaliana* en el genoma del plasto pero inserción sólo transitoria del gen *aadA* utilizando la estrategia siguiente. El gen quimérico *N. tabacum* *psbA* promotor::*aadA*::*A. thaliana* *psbA* 3'UTR se separó de pPB97 por digestión parcial del plásmido con EcoRI y corte completo del mismo con HindIII. Después de las digestiones de restricción, los extremos de los fragmentos resultantes se hicieron romos con la DNA-polimerasa T4. Se aisló un fragmento de 6,5 kb que comprendía el vector con el gen quimérico *ppo*, la secuencia de direccionamiento a los plastos y un fragmento de 1,2 kb que contenía el gen quimérico *aadA*. El fragmento del vector de 6,5 kb se autoligó para producir pEBPPO. Este plásmido se linealizó subsiguientemente con NgomIV, se hizo romo con DNA-polimerasa T4 y se ligó al fragmento 1,2 romo *aadA*, para producir pEBPPOt. Se obtuvieron plásmidos que tenían el gen quimérico *aadA* en cualquier orientación, pero se retuvo únicamente el que tenía *aadA* orientado hacia el gen *bla* del vector (Figura 1).

60

Ejemplo 2: Preparación de un vector de transformación de plastos para integración estable de DNA exógeno enlazado al gen quimérico *ppo* bajo el control del promotor del gen de plastos de maíz 16S Pep-Nep rRNA e integración transitoria de un gen quimérico *aadA* bajo el control del promotor *clpP* de *N. tabacum*.

65 Se obtuvo el plásmido pPB96 por una ligación de cuatro vías del promotor *psbA* de plastos de *N. tabacum* de 149 pb EcoRI-NcoI de pPB30, un fragmento de 1,5 kb NcoI-SpeI de pAT260 que contenía la secuencia codificante *ppo* de *A. thaliana*, un fragmento de 4,0 kb BamHI-SpeI de pPB67b que contenía la 3'UTR *rps16* de plastos de *N. tabacum*

ligada a la porción 16S rDNA de *N. tabacum* de la secuencia de direccionamiento de plastos y el vector pBluescript SK+, y un fragmento de 1,9 kb EcoRI-BamHI de pPB67b que contiene una porción de la secuencia de direccionamiento de plastos rps7/12. Se obtuvo el vector de transformación de plastos pEB8 por ligación de un plásmido pPB96 NgomIV linealizado con extremos romos con un fragmento 1,2 como que contenía un promotor de plastos clpP de *N. tabacum* (descrito en US 6.084.155) fusionado al gen *aadA* y el gen quimérico de la 3'UTR rps16 de plastos de *N. tabacum*, obteniéndose los plásmidos pEB8a y pEB8b, que difieren sólo en la orientación del gen quimérico *aadA* en el plásmido. Únicamente se retuvo para transformación de plastos pEB8a (SEQ ID NO: 2, Figura 2) que tenía *aadA* dirigido hacia el gen *bla* del vector.

5 Ejemplo 3: Transformación biolística del genoma de plastos de tabaco con los vectores de transformación de plastos pEBPPOt y pEB8 y selección (véase el Ejemplo 6 para una descripción detallada de los métodos de transformación y selección).

15 Después de suministro de pEBPPOt (Figura 1, SEQ ID NO: 1) o pEB8 (Figura 2, SEQ ID NO: 2) en el plasto, el vector entero se integra en el genoma del plasto en un primer evento de recombinación. Los transformantes iniciales de plastos se seleccionan por espectinomicina debido a la expresión del gen *aadA* integrado transitoriamente en el genoma del plasto. Dado que las secuencias de cpDNA que flanquean el gen *ppo* en el vector proporcionan dos loci de entrecruzamiento diferentes, la recombinación entre el genoma de los plastos y el vector da como resultado una población mixta de genomas transformados que tienen el vector insertado en conformación diferente (A y B). El cambio a selección con butafenacil favorece la inserción estable del gen *ppo* y la escisión del gen *aadA* junto con la secuencia de la cadena principal del vector. La pérdida de la secuencia del vector está mediada por un evento de intra-recombinación entre secuencias de DNA de repetición directa que se crearon cuando se insertó el vector en el genoma. Adicionalmente, la segregación de la población de plastos bajo selección con butafenacil da como resultado el enriquecimiento de genomas de plastos transformados con *ppo* sin el marcador *aadA* y conducirá finalmente a células homoplásmicas.

20 El análisis PCR de las muestras de DNA a partir de eventos pEBPPOt y pEB8 seleccionados obtenidos por selección inicial con espectinomicina demostró que ambos, el gen *aadA* y el gen *ppo*, están presentes en los transformantes. Subsiguientemente, después de 2 a 3 tandas de subcultivo en medio que contenía butafenacil, el análisis PCR de muestras de DNA de los mismos eventos confirmó la pérdida del gen *aadA*, mientras que el gen *ppo* se retenía en los transformantes.

35 Se utilizó análisis por transferencia Southern para demostrar que el gen *ppo* podía insertarse en el genoma de los plastos por homoplasmicidad después de selección con butafenacil. El DNA celular total de 10 transformantes pEBPPOt que se sometieron a 3 ó 4 tandas de subcultivo en condiciones selectivas de butafenacil se analizó por hibridación de transferencia Southern. El DNA del tipo salvaje y de los transformantes se digirió con BamHI y se hibridó con una sonda específica de DNA de cloroplastos (cpDNA). Esta sonda se hibridaba con un fragmento de 3,3 kb de DNA de tipo salvaje, mientras que se hibridaba predominantemente con un fragmento de DNA de 5,1 kb en 8 de los transformantes, lo que indicaba que el gen *ppo* de 1,8 kb se inserta a homoplasmicidad en la mayoría de estos eventos. En las líneas 4 y 9, son detectables ambos fragmentos, lo que indica la existencia de una población heteroplásmica (mixta) de genomas de plastos de tipo salvaje y transformados con *ppo*. Se observan cuatro poblaciones diferentes de genomas de plastos en estas líneas: un genoma de tipo salvaje (3,3 kb), un genoma transformado con *ppo* (5,1 kb) y genomas insertados con el vector en dos conformaciones diferentes (inserción de vector A y B, 7,6 y 5,8 kb, respectivamente). La repetición del sondado de la transferencia Southern BamHI con una sonda específica de *aadA*, confirmó que los transformantes homoplásmicos añaden la pérdida del marcador antibiótico y que el vector se insertaba en conformación diferente (fragmentos BamHI de 7,6 y 5,8 kb) en los genomas de plastos de las líneas heteroplásmicas 4 y 9. Una transferencia Southern de muestras de DNA digeridas con SpeI sondadas con la misma sonda *aadA* demostró también que sólo las líneas heteroplásmicas 4 y 9 tienen el marcador antibiótico (0,9 kb) mientras que los otros transformantes lo han perdido.

50 Análisis de hibridación Southern de DNA digerido con BamHI para la identificación de transformantes de plastos pEBPPOt homoplásmicos.

55 Se utilizó análisis por transferencia Southern para demostrar que el DNA exógeno ligado al gen *ppo* del vector pEB8 podía insertarse en el genoma del plasto por homoplasmicidad después de selección con butafenacil. El DNA celular total de 2 transformantes pEB8 que se sometieron a 4 tandas de subcultivo en condiciones selectivas con butafenacil se analizó por hibridación de transferencia Southern. El DNA de tipo salvaje y de los transformantes se digirió con BamHI y se hibridó con una sonda específica de DNA de cloroplastos (cpDNA). Esta sonda se hibridó con un fragmento de 3,3 kb de DNA de tipo salvaje, mientras que se hibridaba predominantemente con un fragmento de 6,1 kb de DNA de los transformantes, indicando que la secuencia de 2,8 kb que contenía el DNA exógeno ligado al gen *ppo* se inserta a homoplasmicidad en estos eventos.

Ejemplo 4: Preparación del vector de transformación de plastos para integración inestable de *aadA*
I. Clonación de un nuevo locus diana de plastos

65 Un fragmento de 4,7 kb de DNA de plastos de tabaco (genoma de cloroplastos completo de *N. tabacum*, número de acceso NC_001879, posición 93132 a 97844 y 144782 a 149494) se aisló por amplificación PCR de DNA aislado de

la variedad cultivada de *N. tabacum* 'Xanthi' utilizando un cebador de la cadena superior que comprendía un sitio de restricción XhoI introducido (SEQ ID NO: 13; 5'-AGTTATCTCGAGTGAGAGAAAGAAGTGAGGAAT-3', el sitio XhoI está subrayado) y un cebador de la cadena inferior que comprendía un sitio XbaI (SEQ ID NO: 14; 5'-TTCTCTAGAAGAAATACGGGG-3', el sitio de restricción XbaI está subrayado). Se realizó la amplificación PCR con el kit de DNA-polimerasa Pfu-Turbo (Stratagene, LaJolla CA) en un Termociclador 480 Perkin Elmer de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Perkin Elmer/Roche, Branchburg, NJ) como sigue: 1 ciclo a 95°C durante 5 min, en el que se añadió enzima 2 min antes del final del ciclo, seguido por 30 ciclos de 1 min 94°C/1 min 45°C/4 min 72°C, y luego 1 ciclo durante 10 min a 72°C. El producto de amplificación de 4,7 kb predicho se digirió con XhoI y XbaI y se ligó en los sitios respectivos de pLITMUS28 (New England Biolabs, Beverly MA) para el plásmido pEB-NY2.

II. Construcción del nuevo vector de transformación de plastos

El plásmido pEBNY2 se linealizó con la endonucleasa de restricción PstI. El gen quimérico *aadA* se eliminó de pPB97 por digestión parcial del plásmido con EcoRI y corte total del mismo con HindIII. Después de las digestiones de restricción, los extremos del plásmido de 7,5 kb pEBNY2 linealizado con PstI y del fragmento de 1,2 kb HindIII-EcoRI que contenía el gen quimérico *aadA* se hicieron romos con la DNA-polimerasa T4. Subsiguientemente, estos fragmentos se ligaron uno a otro para producir el plásmido pEBNY2+ *aadA*. Se obtuvieron plásmidos que tenían el gen quimérico *aadA* en cualquier orientación, pero únicamente se retuvo el que tenía *aadA* orientado en dirección opuesta del gen *ycf2*.

El plásmido pEBNY2+ *aadA* se linealizó con la endonucleasa de restricción NdeI. El gen quimérico *ppo* se eliminó de pEBPPO cortándolo con la endonucleasa de restricción PstI. Después de las digestiones de restricción, los extremos del plásmido de 8,6 kb pEBNY2+ *aadA* linealizado con NdeI y el fragmento de 1,8 kb PstI que contenía el gen quimérico *ppo* se hicieron romos con la DNA-polimerasa T4. Subsiguientemente, estos fragmentos se ligaron uno a otro para producir el plásmido pNY2C (SEQ ID NO: 3, Figura 3). Se obtuvieron plásmidos que tenían el gen *ppo* quimérico en cualquier orientación, pero únicamente se retuvo el que tenía *ppo* orientado en la misma dirección que el gen *ycf2*.

Ejemplo 5: Transformación biolística del genoma de plastos del tabaco con pNY2C y selección (véase el Ejemplo 6 para una descripción detallada del método de transformación y selección).

Después de suministro del DNA vector al plasto, se seleccionan transformantes para resistencia a espectinomicina, que es conferida por el gen *aadA* integrado en el gen esencial *ycf2*. Las secuencias de plastos que flanquean ambos genes marcadores seleccionables en el vector de transformación de plastos proporcionan 3 loci de recombinación diferentes y las diferentes combinaciones de eventos de entrecruzamiento doble producirán una población mixta de genomas plásticos transformados que tienen uno o ambos marcadores seleccionables. El cambio a selección con butafenacil dará como resultado la segregación de la producción genómica de plastos mixta y la selección de plastos homoplásmicos que expresan el gen *ppo*. La presión selectiva natural favorecerá la copia de tipo salvaje del gen esencial y dará como resultado por tanto la pérdida completa del gen *aadA*.

El análisis PCR de muestras de DNA de eventos obtenidos por selección inicial con espectinomicina demostró que ambos genes *aadA* y *ppo* están presentes en los transformantes. Subsiguientemente, después de 2 a 3 tandas de subcultivo en butafenacil, el análisis PCR de las muestras de DNA de los mismos eventos confirmó la pérdida del gen *aadA* mientras que se retenía el gen *ppo* en los transformantes.

Se utilizó análisis de transferencia Southern para demostrar que el gen *ppo* podía insertarse en el genoma de los plastos y que se obtenían células homoplásmicas por selección con butafenacil. El DNA celular total de 20 transformantes que se sometieron a 3 ó 4 tandas de subcultivo en medio que contenía butafenacil se analizó por hibridación de transferencia Southern. El DNA del tipo salvaje y de los transformantes se digirió con NcoI y se hibridó con una sonda de DNA específica para la secuencia de plastos de tabaco (NC_001879, posiciones 96811 a 97844). Esta sonda, que reconoce normalmente un fragmento de 2,6 kb NcoI en el tipo salvaje, se hibridaba predominantemente con un fragmento de DNA de 4,4 kb en todos los transformantes, lo que indicaba que el gen *ppo* de 1,8 kb se inserta de manera estable en el plastoma y que se han seleccionado transformantes homoplásmicos en estos eventos.

El análisis de transferencia Southern reveló también que la inserción de *aadA* en el gen esencial *ycf2* después de selección con espectinomicina es inestable. El análisis Southern de muestras de DNA tomadas de dichos 20 transformantes después de selección inicial en medio que contenía espectinomicina que se han descrito anteriormente indicó que el gen quimérico *aadA* se insertaba en el gen esencial diana de los plastos, pero que las células permanecían en el estado heteroplásmico dado que se retenía una determinada porción de copias de tipo salvaje. Una sonda de DNA de plastos de tabaco (NC_001879, posición 94408 a 95861) específica para el locus *aadA* de direccionamiento de los plastos se hibridaba tanto al fragmento de tipo salvaje de 1,4 kb como a un fragmento de 2,6 kb que contenía la inserción *aadA* en todos los transformantes. Después de varias tandas de inserción en butafenacil, la sonda reconocía únicamente el fragmento de DNA de 1,4 kb de tipo salvaje, lo que indicaba que todos los genomas revertían al tipo salvaje y que el gen *aadA* se perdía cuando se retiraba la presión de selección con espectinomicina. Adicionalmente, no se observó señal de hibridación alguna cuando la transferencia Southern se hibridó con una sonda específica de *aadA*.

Ejemplo 6: Transformación y selección de plastos

I. Germinación de las semillas

- 5 Se esterilizan semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) con etanol de 70% durante varios minutos, se lavan 3 a 5 veces con agua estéril, y se extienden luego en placas sobre medio de germinación (Tabla 2, 3). Las placas de germinación se incuban a aproximadamente 25°C con fotoperiodo de 12-16 horas. El medio de germinación (GM) es como sigue: Macro-sales MS ½ x; Micro-sales MS 1 x; vitaminas GM (100 x) 10 ml/l; Na₂EDTA 75 mg/l; FeCl₃·6H₂O 27 mg/l; sacarosa 10 g/l; Phytagar 8 g/l; y pH ajustado a 5,5.
- 10 Las vitaminas GM (100 x) son mezclas como sigue: Inositol 10 g/l; Biotina 5 mg/l; Piridoxina 50 mg/l; Tiamina 50 mg/l; Ácido Nicotínico 500 mg/l; Ácido Fólico 50 mg/l; y Glicina 200 mg/l.

II. Preparación de explantes y suministro de DNA

- 15 Hojas de plantas jóvenes de tabaco de aproximadamente 2 semanas se colocan con la cara adaxial ("cara superior") hacia arriba en el centro de placas que contienen medio de cultivo de tabaco (Tabla 4). Alternativamente, las vitaminas contenidas en este medio pueden reemplazarse por 100 mg/l de inositol y 1 mf/l de tiamina. El bombardeo con partículas se realiza el mismo día. El medio de cultivo de tabaco es como sigue: sales MS 1 x; vitaminas MS ½ x; vitaminas B5 ½ x; BAP 1 mg/l; NAA 0,1 mg/l; sacarosa 30 g/l; y agar purificado Sigma 6 g/l, con el pH ajustado a 5,8.
- 20 La preparación DNA-partículas se realiza como sigue: Se esterilizan 60 mg de partículas (wolframio u oro) con 0,5 ml de etanol de 70%, se lavan dos veces con 0,5 ml de agua bidestilada estéril, y se resuspenden luego en 1 ml de glicerol al 50%. A una parte alícuota de 100µl de la suspensión de partículas, se añaden secuencialmente 10µg de DNA, 100 µl de CaCl₂ 2,5 M, 50 µl de espermidina 0,1 M y se mezcla suavemente después de cada adición. Las partículas recubiertas de DNA se centrifugan brevemente, seguido por un solo lavado con 200 µl de etanol de 70% y otro lavado con 200 µl de etanol 100%. Se resuspenden luego las mismas en 100 µl de etanol 100%. Para cada bombardeo, se utilizan 5 a 10 µl de DNA-partículas.

- 30 El bombardeo se lleva a cabo utilizando la pistola de helio PDS 1000 (Bio-Rad, Richmond, CA), siguiendo una modificación del protocolo descrito por el fabricante. Las placas con los explantes diana se colocan en el tercer estante del fondo de la cámara de vacío, se bombardean con discos de rotura a 650 p.s.i. con disparos simples o múltiples por placa.

III. Selección de plantas homoplásmicas transplastómicas que expresan el gen *ppo* en sus plastos.

35 a) Selección Inicial

- La selección inicial se lleva a cabo con espectinomicina como el agente de selección, o con la combinación de espectinomicina y Fórmula XVII en el caso de selección dual. Se añade espectinomicina a 500 mg/l al medio de cultivo de tabaco en cualquier caso, mientras que se añade Fórmula XVII al medio en concentraciones de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 10 nM, con preferencia aproximadamente 5 nM a aproximadamente 25 nM o, de modo alternativo, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nM.

- 45 Una semana después del bombardeo, se transfieren los explantes a medio de cultivo de tabaco que contiene el o los agentes de selección, con las caras bombardeadas directamente en contacto con el medio de selección. Cuando se incluye Fórmula XVII en el medio de selección, se prefiere cortar los explantes en pequeños trozos, para facilitar una selección más eficiente. Después de aproximadamente 2 a 4 semanas de selección en medio que contiene espectinomicina, los explantes o, si son identificables, los transformantes resistentes, se llevan ulteriormente a la fase siguiente de la selección a fin de obtener plantas homoplásmicas que expresan el gen *ppo* en sus plastos.

- 50 El fenotipo de selección del sistema de selección dual es notablemente diferente del fenotipo obtenido con la selección con espectomicina sola. En el caso de la selección con espectomicina sola, el fenotipo de selección está pigmentado en verde, en cuyo caso los transformantes pigmentados en verde se identifican contra el tejido blanco no transformado. En contraste, en el medio de selección que contiene Fórmula XVII, los transformantes aparecen siempre como callos blancos a amarillentos, sobre un fondo de tejido pardo no transformado.

- 55 El fenotipo de selección con el compuesto letal de selección Fórmula XVII es particularmente importante para la selección de aquellos tipos de tejido que no cambiarían a color verde en las condiciones de cultivo utilizadas para la selección. Es más deseable y practicable seleccionar tejido blanco o amarillento contra el tejido pardo, como en el caso con el compuesto letal Fórmula XVII, que selecciona tejido blanco o amarillento contra el tejido blanco.

60 b) Selección secundaria de eventos homoplásmicos que expresan el gen *ppo* en el plastoma.

- Los explantes bombardeados o los transformantes primarios seleccionados se transfieren a medio de cultivo de tabaco que contiene únicamente Fórmula XVII como el agente de selección en concentraciones que van desde aproximadamente 25 nM a aproximadamente 50 nM o aproximadamente 50 nM a aproximadamente 250 nM para segregación y selección ulterior.

Los tejidos se cortan en pequeñas piezas durante el cultivo y posteriormente cada subcultivo, a fin de asegurar un mejor contacto del tejido con el medio, y por tanto una selección más eficiente. Después de varias tandas de selección, se recogen muestras de los transformantes y se analizan por Transferencia Southern. De 10 transformantes independientes analizados, se confirmó que 8 eran transformantes homoplásmicos que tenían el gen *ppo* integrado en su plastoma, pero no el gen *aadA*. Los otros dos eventos eran heteroplásmicos que contenían ambos genes (Tabla 1).

5

IV. Regeneración de plantas homoplásmicas y expresión del gen *ppo* en los plastos

10 Se regeneran eventos homoplásmicos *ppo* para formar brotes en medio de cultivo de tabaco que contiene el agente de selección. La concentración de citoquinina en el medio puede duplicarse para mejorar la regeneración. Los brotes obtenidos se enraízan individualmente en medio de cultivo de tabaco exento de hormonas, con o sin el agente de selección.

15 La homoplasma de cada planta individual transferida al invernadero se confirmó por transferencia Southern o PCR. Todas las plantas son fértiles y exhiben un fenotipo normal. La expresión del gen *ppo* en plantas homoplásmicas se evalúa por un ensayo ELISA. Los datos obtenidos se compararon con los de transformantes nucleares de tabaco que expresaban el gen *ppo* en el núcleo. El ensayo ELISA demostró un aumento significativo de la concentración de proteína PPO en las plantas de plastos transplastómicas comparadas con los transformantes nucleares (Tabla 5).

20 Tabla 1. Cuantificación de la proteína PPO en plantas transplastómicas homoplásmicas y en transformantes nucleares que expresan el gen *ppo*

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

Ejemplo 7: Transformación de plastos de tomate

25

Se utilizó el genotipo de tomate ZTV840 de la elite Syngenta para transformación de plastos. La esterilización de las semillas, la germinación y el bombardeo de las hojas se realizaron como se ha descrito previamente para la transformación de plastos de tabaco (Ejemplo 6).

30 Dos días después del bombardeo, se transfirieron las hojas de tomate al medio de selección con 500 mg/l de espectinomicina, y se cultivaron bajo luz débil. Una mes más tarde, se cortaron las hojas en pequeñas piezas y se subcultivaron en el mismo medio de selección. Los eventos transplastómicos comenzaron a aparecer después de dos meses de la selección. Se obtuvieron dos eventos con 10 placas bombardeadas con un constructo estable *aadA*-PPO, y otros dos eventos de 11 placas bombardeadas con el constructo transitorio *aadA*: PPO estable (pEBPPOt).

35

Cuando comenzaron a aparecer los cuatro eventos, los mismos estaban constituidos por callos blandos muy friables con un ligero matiz de color verde. Estos eventos se transfirieron luego a medio que contenía 50 a 75 nM de Fórmula XVII para la segunda fase de selección. Tres de los cuatro eventos sobrevivieron a la selección con Fórmula XVII y continuaron creciendo en el medio de selección durante más de 6 meses.

40

Ejemplo 8: Nivel alto de tolerancia a los herbicidas obtenido con las plantas transplastómicas homoplásmicas PPO
Se obtienen niveles mucho mayores de tolerancia a los herbicidas con las plantas transplastómicas homoplásmicas que expresan *ppo* en sus plastos que con transformantes nucleares que expresan *ppo*. Las plantas de tabaco PPO transplastómicas sobrevivían muy bien con el tratamiento de Fórmula XVII hasta la concentración de 2000 nM, el nivel máximo de herbicida testado, mientras que el mismo estudio los transformantes nucleares exhibían sensibilidad cuando se trataron con Fórmula XVII a una concentración superior a 100 nM.

45

Ejemplo 9: Expresión de transgenes en plastos utilizando el nuevo promotor

50 La siguiente invención proporciona secuencias de ácido nucleico de origen no plastídico útiles para la expresión de genes transgénicos en plastos. Existen sólo un número limitado de elementos reguladores de genes tales como promotores, región 5' no traducida (5'UTR) y región 3' no traducida (3'UTR) disponibles para expresión de transge-

nes de plastos, y la mayoría de ellos son secuencias plastídicas. Dado que los genomas plastídicos son muy activos en recombinación homóloga, la inserción de secuencias endógenas en el genoma como elemento regulador podría producir reordenamientos genómicos dando como resultado pérdida o desactivación de la función transgénica. Con objeto de evitar una transformación genómica de este tipo, deberían utilizarse como elementos reguladores secuencias extrañas que compartieran poca homología con la secuencia de DNA genómica de los plastos para la expresión de los transgenes plastídicos.

5

Nuevo promotor

10 La secuencia semejante al promotor del bacteriófago X2 de *Staphylococcus aureus*, que se confirmó era capaz de promover la expresión génica en *E. coli* (Carbonelli et al., FEMS Micro. Letters 177: 75-82, 1999), se testó respecto a su capacidad para promover la expresión génica en plastos de tabaco. La secuencia X2 (SEQ 10) contiene características promotoras de tipo bacteriano tales como la región del hexanucleótido canónico -10 (TATAAT) y la región -35 (TTGCTG) y una secuencia del promotor -16 (TRTG), que se observa también en muchos promotores de cloroplastos PEP. La secuencia X2 (posición 141 a 219 de la secuencia publicada) se enlazó a la secuencia 5' no traducida funcional en plastos y se fusionó a un gen informador en un vector de transformación de plastos de tabaco. SEQ ID NO: 15 Promotor del bacteriófago X2 de *Staphylococcus aureus*

15

GTAAAGAAT GTAGCTGACT GCATACTTAA ACCACCCATA CTAGTTGCTG GGTGGTTTTT 60
ATGTTATAAT ATAAATGTG 79

20 Nueva región 5' no traducida con secuencia de tipo Shine-Dalgarno

En los plastos de plantas terrestres, las secuencias mRNA 5'UTR son esenciales para la estabilidad del mRNA y el proceso de iniciación de la traducción. Las 5'UTRs de la mayoría de los genes de plastos fuertemente expresados contienen una secuencia del tipo Shine-Dalgarno que es complementaria al extremo 3' de plastos rRNA 16S y se cree que juega un papel predominante en la iniciación de la traducción. Es posible que secuencias extrañas que contengan una secuencia del tipo Shine-Dalgarno puedan funcionar como elemento de traducción de genes de plastos. Se ha demostrado previamente que la secuencia 5'UTR del gen 10 del bacteriófago T7, que contiene un elemento SD, es muy eficiente en promover la traducción en plastos (McBride et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 7301-7305; Ye et al., (2001) Plant J. 25:261-270; Kuroda y Maliga (2001) Nucl. Acids Res. 29: 970-975). La secuencia siguiente del gen 10 del bacteriófago de *Kluyvera* y el gen 9 del bacteriófago T3 se testaron respecto a su capacidad para actuar como secuencias 5'UTR para la expresión de genes de plastos.

25

SEQ ID NO: 16: 5'UTR del gen 10 del bacteriófago kvp1 de *Kluyvera*

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

35 SEQ ID NO: 17 5'UTR del gen 9 del bacteriófago T3

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

La obtención del vector de transformación de plastos que contiene PPO tiene un marcador seleccionable que está bajo el control del promotor del bacteriófago X2

40 Amplificación de la 5'UTR del gen 10 del bacteriófago kvp1

La 5'UTR del gen 10 de kvp1 se aisló por amplificación PCR a partir de un plásmido que contenía el gen 10 de kvp1 utilizando un cebador de la cadena superior que comprendía un sitio de restricción XbaI introducido en el extremo 5' de la región 5'UTR (5' GTTCTAGAGACATTACGTTCTCCCCTTG 3' (el sitio XbaI está subrayado) SEQ ID NO: 28) y un cebador de la cadena inferior que comprendía un sitio de restricción NcoI introducido que solapaba el codón de iniciación ATG (5' AGATATCCATGGTGAATCTCCTGTTGATT 3' (el sitio de restricción NcoI está subrayado) SEQ ID NO: 29). La amplificación PCR de un fragmento de 119 pb se realizó con el kit de DNA-polimerasa taq (QIAGEN, Valencia CA) en un Termociclador 480 Perkin Elmer de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Perkin Elmer/Roche, Branchburg, NJ) como sigue: 5 min 95°C, seguido por 5 ciclos de 1 min 95°C/1 min 40°C/15 s 72°C, y luego 25 ciclos de 1 min 95°C/1 min 55°C/15 s 72°C.

45

Se creó el plásmido pEBPKVP-10 por ligación del fragmento XbaI-NcoI de 105 pb del fragmento amplificado 5'UTR del gen 10 de kvp1 con un fragmento XbaI-NcoI de 8,0 kb del vector pEBPaccD. Se creó el plásmido pEBKvp10-GFP por ligación de un fragmento NcoI/BamHI de 5,2 kb de pEBPKVP10 con un fragmento 1,8 kb de pPB69b, que contenía el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) enlazado a la 3'UTR psbA de los plastos de *A. thaliana*.

55

Se amplificó el promotor 16S NEP-PEP de maíz por PCR a partir de pPB98 utilizando un cebador de la cadena superior que comprendía una restricción EcoRI introducida en el extremo 5' de la región promotora del gen rRNA 16S (5' GCCAGAATTCACCACGATCGAACGGGAATGGATA 3' (el sitio EcoRI está subrayado)) (SEQ ID NO: 20) y

un cebador de la cadena inferior que comprendía un sitio de restricción XbaI introducido en el extremo 3' de la región promotora del gen rRNA 16S (5' CTCTAGAGATTTCGGAATTGTCTTTCCTT 3' (el sitio de restricción XbaI está subrayado) SEQ ID NO: 21). La amplificación PCR de un fragmento de 164 pb se realizó con el kit de DNA-polimerasa Pfu Turbo (Stratagene, LaJolla CA) en un Termociclador 480 de Perkin Elmer de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Perkin Elmer/Roche, Branchburg, NJ) como sigue: 5 min 95°C, seguido por 35 ciclos de 1 min 95°C/1 min 50°C/15 s 72°C.

5

La secuencia del promotor rRNA 16S amplificado se cortó con XbaI y EcoRI, y el fragmento de 152 pb resultante se ligó a un fragmento XbaI-EcoRI de 6,0 kb del vector de transformación de plastos pB98. El plásmido resultante se cortó subsiguientemente con XbaI y BamHI y un fragmento de 5,1 kb aislado del producto de digestión se ligó con un fragmento XbaI-BamHI de 1,9 kb de pEBPKVP10-GFP, que contenía el gen 10 de *kvp1* 5'UTR::GFP::A. *thaliana* *psbA* 3'UTR quimérico, para dar pEBZM16SKGFP.

10

Construcción del plásmido RTK7 que tiene

15

La 5'UTR del gen del bacteriófago T3 de 116 pb se amplificó por PCR a partir de un plásmido utilizando un cebador de la cadena superior (RTK36) que comprendía un sitio de restricción NcoI introducido en el extremo 3' de la 5'UTR del gen 9 de T3 (5' GAAGATGCCATGGATTAATCTCCTAAGTTATTAAG 3' (el sitio NcoI está subrayado) SEQ ID NO: 22) y un cebador de la cadena inferior (RTK39) que comprendía un sitio SmaI introducido en el extremo 5' de la 5'UTR (5' CGAATCTCTTCCCGGGTAGAGGGAGACCTCATCTTTG 3' (el sitio de restricción SmaI está subrayado) SEQ ID NO: 23). Un fragmento de 328 pb que contenía el promotor del gen 16S PEP-NEP rRNA de maíz y el promotor del gen *psbA* de tabaco se amplificó por PCR a partir de pEBT3-9 GFP utilizando un cebador de la cadena superior (RTK38) que comprendía un sitio de restricción SmaI introducido en el extremo 3' del promotor 16S PEP-NEP de maíz (5' CTCCTCTACCCGGGAAGAGATTTCGGAATTGTCTTCC 3' (el sitio SmaI está subrayado) SEQ ID NO: 24) y un cebador de la cadena inferior (RTK37) que comprendía un sitio BspHI introducido en el extremo 3' de la 5'UTR *psbA* (5' CGCTTAGTCATGATAAAATCTTGGTTTATTTAATCATC 3' (el sitio de restricción BspHI está subrayado) SEQ ID NO: 25). Los productos PCR se purificaron, se mezclaron en ratio igual en moles con cebadores RTK36 y RTK37 y la mezcla se utilizó para amplificar por PCR un fragmento de 421 pb. Las PCRs se realizaron con el kit de DNA-polimerasa Pfu Turbo (Stratagene, LaJolla CA) en un Termociclador 480 Perkin Elmer de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Perkin Elmer/Roche, Branchburg, NJ).

20

25

30

Para obtener el plásmido RTK7, se creó primeramente el plásmido RTK6 que tenía los genes *ppo* y *gus* clonados en orientación opuesta por ligación de un fragmento HindIII-NcoI de 7,5 kb de pEB8a, el vector de transformación con el gen quimérico *rps16 ppo::N. tabacum*3'UTR, con un fragmento HindIII-NcoI de 2,1 kb que contenía el gen *gus::A. thaliana psbA* 3'UTR del plásmido pEBPKVP10. Se obtuvo finalmente el plásmido RTK7 por ligación de un RTK6 de 9,6 kb linealizado con NcoI con los promotores 16S y *psbA* de maíz NcoI-BspHI de 405 pb amplificados por PCR. Únicamente se retuvo el plásmido que tenía el promotor *psbA* que activaba *ppo* y el promotor 16S PEP-NEP de maíz que activaba *gus*.

35

40

Construcción de una secuencia semejante al promotor del bacteriófago X2 fusionada al gen quimérico gen 10 de *kvp1* 5'UTR::GFP::A. *thaliana* *plasto psbA* 3'UTR.

Se creó un fragmento EcoRI-XbaI de 85 pb constituido por la secuencia semejante al promotor del bacteriófago X2 por reasociación de un oligonucleótido de la cadena superior (5'

45

AATTCGTTAAAGAATGTAGCTGACTGCATACTTAAACCACCCATACTAGTTGCTG

GGTGGTTTTTATGTTATAAATAAAATGTGT 3') (SEQ ID NO:26) con el oligonucleótido

complementario siguiente de la cadena inferior: 5'

CTAGACACATTTATATTATAACATAAAAACCACCCAGCAACTAGTATGGGTGGTT

TAAGTATGCAGTCAGCTACATTCTTTAACG 3')(SEQ ID NO:27). Se creó el plásmido PEBX2

por ligación del fragmento EcoRI-XbaI de 85 pb creado con un fragmento EcoRI-XbaI de 6,8 kb del plásmido pEBZM16SKGFP, que contenía el gen 10 de *kvp1* 5'UTR::GFP::A. *thaliana psbA* 3'UTR con el resto del vector de transformación de plastos.

50

Construcción del vector de transformación de plastos pEB10

55

Se creó el plásmido pEB9 por ligación de un fragmento BglIII-NcoI de 200 pb de pEBX2, que contenía la secuencia semejante al promotor X2 fusionada a la 5'UTR del gen 10 de *kvp1*, y un fragmento BglIII-NcoI de 8,5 kb del vector de transformación de plastos pEB8a.

1 AATTCGTTAA AGAATGTAGC TGACTGCATA CTTAAACCAC CCATACTAGT
50 TGCTGGGTGG TTTTATGTT ATAATATAAA TGTGCTAGA GACATTACGT
100 TCTCCCCTTG AGTGATACAC AATGAGAACC AACTCGTTTC AAGTAGTACC
150 TCACATAACT TATCTTTTAA ATCAACAGAA GGAGATTCAC **Catg**

Secuencia de DNA de la quimera de las secuencias semejantes al promotor del bacteriófago X2 de *Staphylococcus aureus* fusionada a la 5'UTR del gen 10 del bacteriófago kvp1. La secuencia X2 está subrayada; el codón de iniciación (ATG) está escrito en versalitas. SEQ ID NO: 18).

5 Se creó el vector pEB10 final de transformación de plastos por ligación de un fragmento BglIII-HindIII de 7,8 kb de pEB9 con un fragmento de 2,3 kb de pRTK7, que contenía el gen quimérico pMz16SNEP::T3-9 5'UTR::uidA::3' psbA.

10 Ejemplo 10: Transformación de plastos con pEB10

El gen informador quimérico resultante se introdujo de manera estable en el genoma de plastos de tabaco utilizando el protocolo de selección dual de transformación de plastos descrito en el caso de la Solicitud US 70149. De 6 plastos bombardeados, se encontró un evento que era capaz de crecer en 50 nM de butafenacil después de dos tandas de selección con espectinomicina. Después de tres tandas de selección en butafenacil, el evento se confirmó por análisis Southern, encontrándose que era homoplásmico para inserción en los genomas de cloroplastos de los genes PPO y gus. La actividad de GUS se visualizó por ensayos de GUS estándar.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Syngenta Participations AG
 Boudreau, Eric
 Gu, Weining
 De Framond, Anic
 Heifetz, Peter

<120> Transformación de plastos

<130> 70149WOPCT

<140> PCT/US03/31941
 <141> 2003-10-17

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

<160> 29

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 7652
 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Vector de transformación de plastos pEBPPot (Ejemplo 1 VII)

<400> 1

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

ES 2 381 667 T3

ttgactaccg attccgaagg aactggagtt acatctcttt tccattcaag agttcttatg 1140
 cgtttccacg cccctttgag accccgaaaa atggacaaat tccttttctt aggaacacat 1200
 acaagattcg tactacaaa aaggataatg gtaaccctac cattaactac ttcatttatg 1260
 aatttcatag taatagaaat acatgtccta ccgagacaga atttggaact tgctatcctc 1320
 ttgcctagca ggcaaagatt tacctccgtg gaaaggatga ttcattcgga tcgacatgag 1380
 agtccaacta cattgccaga atccatgttg tatatttgaa agaggttgac ctctttgctt 1440
 ctctcatggt aactctctt tcccgccgag ccccttttct cctcggcca cagagacaaa 1500
 atgtaggact ggtgccaaaca atccatcaga ctactaagt cgggatcact aactaatact 1560
 aatctaatat aatagtctaa tatatctaata ataatagaaa atactaatat aatagaaaag 1620
 aactgtcttt tctgtatact ttccccggtt ccggttgctac cgcgggcttt acgcaatcga 1680
 tcggattaga tagatatccc ttcaacatag gtcacgaaa ggatctcgga gaccaccaa 1740
 agtacgaaag ccaggatctt tcagaaaacg gattcctatt caaagagtgc ataaccgcat 1800
 ggataagctc aactaaccg gtcaatttgg gatccaaatt cgagattttc cttgggaggt 1860
 atcgggaagg atttcgtacc caattcggcc tatagtgagt cgtattaca ttcactggcc 1920
 gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgcta cccaacttaa tcgccttgca 1980
 gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc 2040
 caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgcgacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc 2100
 gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcggcc 2160
 gtcctttcg ctttcttccc ttcttttctc gccacgttcg ccggaattcg aatagatcta 2220
 catacacctt ggttgacacg agtatataag tcatgttata ctggtgaata acaagccttc 2280
 cttttctat ttgatttgt agaaaactag tgtgcttggg agtccctgat gattaaataa 2340
 accaagattt taccatgagg gaagcgggtga tcgccgaagt atcgactcaa ctatcagagg 2400
 tagttggcgt catcgagcgc catctcgaac cgacgttgct ggccgtacat ttgtacggct 2460
 ccgagtgga tggcggcctg aagccacaca gtgatattga tttgctggtt acggtgaccg 2520
 taaggcttga tgaaacaacg cggcgagctt tgatcaacga ctttttgaa acttcggctt 2580
 ccctggaga gagcgagatt ctccgcgtg tagaagtcac cattgttggt cagcagaca 2640
 tcattccgtg gcgttatcca gctaagcgcg aactgcaatt tggagaatgg cagcgaatg 2700
 acattcttgc aggtatcttc gagccagcca cgatcgacat tgatctggct atcttgctga 2760
 caaaagcaag agaacatagc gttgccttgg taggtccagc ggccggaggaa ctctttgatc 2820
 cggttcctga acaggatcta tttgaggcgc taaatgaaac cttaacgcta tggaaactgc 2880
 cgcccgactg ggctggcgat gagcgaatg tagtgcttac gttgtcccgc atttggtaca 2940
 gcgcagtaac cggcaaaatc gcgccgaagg atgtcgtcgc cgactgggca atggagcgc 3000
 tgccggcca gtatcagccc gtcatacttg aagctagaca ggcttatctt ggacaagaag 3060
 aagatcgctt ggcctcgcgc gcagatcagt tggagaat tgtccactac gtgaaaggcg 3120

ES 2 381 667 T3

agatcaccaa ggtagtcggc aaataatgtc taacaattcg ttcaaactag aactagttag 3180
 tgtagtcta aatctagttt agtaaaaaac gagcaatata agccttcttt aaataagaaa 3240
 gagggcttat attactcgtt tttttctata aaaatgagca aatttttata gagtatcata 3300
 ttttacttta tttattatat taataataaa taataataat aaataataaa aaattactat 3360
 atatTTTTTA ttagaagctc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta 3420
 gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gacccccaaa aacttgatta gggatgaggt 3480
 tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg 3540
 ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat 3600
 tcttttgatt tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggtaaaaaa tgagctgatt 3660
 taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt ttacaatttc ccagggtggca 3720
 cttttcgggg aatgtgctc ggaaccctta tttgtttatt tttctaaata cattcaata 3780
 tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aatgcttca ataatttga aaaaggaaga 3840
 gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgccgca ttttgccctc 3900
 ctgtttttgc tcaccagaa acgctgggta aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg 3960
 cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc 4020
 ccgaagaacg tttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat 4080
 cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact 4140
 tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat 4200
 tatgcaagtgc tgccataacc atgagtgata aactgctggc caacttactt ctgacaacga 4260
 tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcaacaacat gggggatcat gtaactcgcc 4320
 ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaa cgacgagcgt gacaccacga 4380
 tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta ctactctag 4440
 cttcccggca acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga cacttctgc 4500
 gctcggccct tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt 4560
 ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct 4620
 acacgacggg gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg 4680
 cctcactgat taagcattgg taactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg 4740
 atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca 4800
 tgacaaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga 4860
 tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa 4920
 aaccaccgct accagcgggt gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga 4980
 aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ctttctagtg tagccgtagt 5040
 taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg ctaatcctgt 5100
 taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat 5160

agttaccgga taaggcgag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct 5220
 tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca 5280
 cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag 5340
 agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc 5400
 gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga 5460
 aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca 5520
 tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag 5580
 ctgataaccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagttagc gaggaagcgg 5640
 aagagcggcc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct 5700
 ggcacgacag gtttcccagc tggaaagcgg gcagttagcg caacgcaatt aatgtgagtt 5760
 agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttggtg 5820
 gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc 5880
 tcgaaattaa ccctcactaa agggaacaaa agctggagct ccaccgccgc gcccaatcat 5940
 tccggataac gcttgcattc tctgtattac cgcggctgct ggcacagagt tagccgatgc 6000
 ttattcccca gataccgtca ttgcttttc tccgggaaaa gaagttcacg acccgtgggc 6060
 cttctacctc cacgcggcat tgctccgtca ggctttcgcc cattgcggaa aattccccac 6120
 tgctgcctcc cgtaggagtc tgggccgtgt cttagtccca gtgtggctga tcatcctctc 6180
 ggaccagcta ctgatcatcg ccttggttag ctattgcctc accaactagc taatcagacg 6240
 cgagcccctc ctggggcgga ttctctcttt tgctctcag cctacggggt attagcagcc 6300
 gtttccagct gttgttcccc tcccaagggc aggttcttac gcgttactca cccgtccgcc 6360
 actggaaaca ccacttcccg tccgacttgc atgtgttag catgccgcca gcgttcatcc 6420
 tgagccagga tcgaactctc catgagattc atagttgcat tacttatagc ttccttgttc 6480
 gtagacaaag cggattcgga attgtctttc attccaaggc ataacttgta tccatgcgct 6540
 tcatattcgc cgggagttcg ctcccagaaa tatagccatc cctgccccct cacgtcaatc 6600
 ccacgagcct cttatccatt ctattgaac gacggcgggg gagcaaatcc aactagaaaa 6660
 actcacattg ggcttaggga taatcaggct cgaactgatg acttccacca cgtcaagggtg 6720
 aactctacc gctgagttat atcccttccc cgcctcatcg agaaatagaa ctgactaatc 6780
 ctaagtcaaa gggctgagaa actcaacgcc actattcttg aacaacttg agccgggcct 6840
 tctttctgca gttcaatgga agcaatgata aaaaaataca aatagaaaag gaaagggagg 6900
 aaatacaaaa aatagaaga gaaaagtcac acaaagttat atacaaatga ctacccccct 6960
 ttttgatttt ccttaattta tttccttaat tgaatttcgg ttgaactagt ctgggagatt 7020
 taatgtttta catttacttg taagcgtacc gtgacatgaa gttgttgacc tcaatcgcgg 7080
 tttcatatgc gccttctaca caccggccta aggctacacc agcgcgtaa ttgccacca 7140
 aaaatagccc ttcgtagccc gaagacgtta gagatgattt agccgtgtca aggatatcaa 7200

ES 2 381 667 T3

```

agtgaccaac tagaaactga ggaatggctt gaggccatac cctaactcct aatttaagtg 7260
gatcggtcga attaggctta attagcattt tcctcaaate tctgtcaact gcttccacta 7320
actcaccttc agacttggac agaattccgg tgtttgtaga cccgccaatc atgttcaaca 7380
gcaaaattct tccgggcggt gcgcgatttg gaaagagtga ggagctgtag atagtctcta 7440
atgtttcaac tccttgcgtg cgtggatgca attgccc aaa accctttagt tcaccatcta 7500
tcaaacattc tgttcggatt gcttctttcg ggtacgagat agatactgct gcaactggtg 7560
ggtaatatag ttttgagagt gcatttgca gagattcaga aagagggcgc aagagaccgc 7620
ttgcaacatg agatggcacc gtcattacaa ca 7652

```

```

<210> 2
<211> 8684
<212> DNA

```

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Vector de transformación de plastos pEB8 (= pEB8a) (Ejemplo 2).

```

<400> 2
tttaactcga ttctatttac taatgtatca cttcgaatt ttacttcagc tcttgtttta 60
taattacat cacctttgaa gaagattggt ctttcttgta cgtaaccttc aggcatgct 120
gatttgaaga aatcatgttg tttcatatga tcaggatatac ttgcgaaaca ttgtactcca 180
tatccgaatg ttgatactaa tgttggccaa ggtacaggta atttacctgt tgtacagatg 240
aattttaatg ttaatttacc atatgtagca tcaccttcac cttcacctga tactgagaat 300
ttatgacat ttacatcacc atctaattct actaagatag gtactactcc agtgaataat 360
tcttcacctt ttgaagccat gaatccctcc ctacaactat ccaggcgctt cagattcgcc 420
cggagttcgc tcccagaaat atagccatcc ctgccccctc acgtcaatcc cagcagcctc 480
ttatccattc tcattgaacg acggcgaatt cgaatagatc tacatacacc ttggttgaca 540
cgagtatata agtcatgtta tactgttgaa taacaagcct tccattttct attttgattt 600
gtagaaaact agtgtgcttg ggagtccttg atgattaaat aaaccaagat ttaccatgg 660
attgtgtgat tgtcggcgga ggtattagtg gtctttgcat cgctcaggcg cttgctacta 720
agcatcctga tgctgctccg aatttaattg tgaccgaggc taaggatcgt gttggaggca 780
acattatcac tcgtgaagag aatggttttc tctgggaaga aggtcccaat agttttcaac 840
cgtctgatcc tatgctcact atggtggtag atagtggttt gaaggatgat ttggtgttgg 900
gagatcctac tgcgccaagg tttgtgttgt ggaatgggaa attgaggccg gttccatcga 960
agctaacaga cttaccgttc tttgatttga tgagtattgg tgggaagatt agagctggtt 1020
ttggtgcaact tggcattcga ccgtcacctc caggctcgtga agaattctgtg gaggagtttg 1080
tacggcgtaa cctcggtgat gaggtttttg agcgcctgat tgaaccgttt tgttcaggtg 1140
tttatgctgg tgatccttca aaactgagca tgaagcagc gtttgggaag gtttggaaac 1200
tagagcaaaa tgggtggaagc ataataggtg gtacttttaa ggcaattcag gagaggaaaa 1260

```

ES 2 381 667 T3

acgctcccaa ggcagaacga gacccgcgcc tgccaaaacc acagggccaa acagttgggt 1320
 ctttcaggaa gggacttcga atgttgccag aagcaatatt tgcaagatta ggtagcaaag 1380
 ttaagttgtc ttggaagctc ttaggtatca ctaagctgga gagcggagga tacaacttaa 1440
 catatgagac tccagatggg ttagtttccg tgcagagcaa aagtgttgta atgacggtgc 1500
 catctcatgt tgcaagcggg ctcttgcgcc ctctttctga atctgctgca aatgcactct 1560
 caaaactata ttaccacca gttgcagcag tatctatctc gtaccgaaa gaagcaatcc 1620
 gaacagaatg tttgatagat ggtgaactaa agggttttgg gcaattgcat ccacgcacgc 1680
 aaggagttga aacattagga actatctaca gtcctcact ctttccaaat cgcgcaccgc 1740
 ccggaagaat tttgctgttg aacatgattg gcgggtctac aaacaccgga attctgtcca 1800
 agtctgaagg tgagttagtg gaagcagttg acagagattt gaggaaaatg ctaattaagc 1860
 ctaattcgac cgatccactt aaattaggag ttagggtagt gcctcaagcc attcctcagt 1920
 ttctagttgg tcactttgat atccttgaca cggctaaatc atctctaacg tcttcgggct 1980
 acgaagggct atttttgggt ggcaattacg tcgctgggtg agccttaggc cgggtgtgtag 2040
 aaggcgcata tgaaccgcg attgaggtca acaacttcat gtcacggtac gcttacaagt 2100
 aaatgtaaaa cattaatct cccagactag ttcaaccgaa attcaattaa ggaaataaat 2160
 taaggaaata caaaaagggg ggtagtcatt tgtatataac tttgtatgac ttttctcttc 2220
 tatttttttg tatttctcc ctttcctttt ctattttagt tttttatca ttgcttccat 2280
 tgaactgcag aaagaaggcc cggctccaag ttgttcaaga atagtggcgt tgagtttctc 2340
 gaccctttga cttaggatta gtcagttcta tttctcgatg gggcggggaa gggatataac 2400
 tcagcggtag agtgtcacct tgacgtgggtg gaagtcatca gttcagacct gattatccct 2460
 aagcccaatg tgagtttttc tagttggatt tgctccccg ccgctggtca atgagaatgg 2520
 ataagaggct cgtgggattg acgtgagggg gcagggatgg ctatatttct gggagcgaac 2580
 tccgggcgaa tatgaagcgc atggatacaa gttatgcctt ggaatgaaag acaattccga 2640
 atccgctttg tctacgaaca aggaagctat aagtaatgca actatgaatc tcatggagag 2700
 ttcgatcctg gctcaggatg aacgctggcg gcatgcttaa cacatgcaag tcggacggga 2760
 agtgggtgtt ccagtggcgg acgggtgagt aacgcgtaag aacctgccct tgggagggga 2820
 acaacagctg gaaacggctg ctaatacccc gtaggctgag gagcaaaagg aggaatccgc 2880
 ccgaggaggg gctcgcgtct gattagctag ttggtgaggc aatagcttac caaggcagatg 2940
 atcagtagct ggtccgagag gatgatcagc cacttgaggc ctgagacacg gccagactc 3000
 ctacgggagg cagcagtggg gaattttccg caatgggcga aagcctgacg gagcaatgcc 3060
 gcgtggaggt agaaggcca cgggtcgtga acttcttttc ccggagaaga agcaatgacg 3120
 gtatctgggg aataagcatt ggctaactct gtgccagcag ccgcggtaat acagaggatg 3180
 caagcgttat ccggaatgat tgggcgcggc ggtggagctc cagcttttgt tccctttagt 3240
 gagggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttctgtg tgaattggt 3300

ES 2 381 667 T3

atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg 3360
 cctaagttagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg 3420
 gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc 3480
 gtattgggcg ctcttcgct tctcgcctca ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc 3540
 ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 3600
 acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3660
 cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3720
 caagtacagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa 3780
 gctccctcgt gcgctctct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 3840
 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 3900
 aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 3960
 ccttatccgg taactatcgt cttgagttca acccggtaa acacgactta tcgccactgg 4020
 cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcggtgct acagagttct 4080
 tgaagtggg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc 4140
 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 4200
 ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 4260
 aagaagatcc tttgatcttt tctacggggg ctgacgctca gtggaacgaa aactcacggt 4320
 aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaa 4380
 aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat 4440
 gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct 4500
 gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggcct accatctggc cccagtgctg 4560
 caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag 4620
 ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc gcctccatc cagtctatta 4680
 attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcg aacgttggtg 4740
 ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg 4800
 gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat cccccatgt gtgcaaaaaa gcggttagct 4860
 ccttcgggcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatgggta 4920
 tggcagcact gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg 4980
 gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc 5040
 cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg 5100
 gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga 5160
 tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg 5220
 ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccg caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat 5280
 gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgct 5340

ES 2 381 667 T3

tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca 5400
 catttccccg aaaagtcca cctgggaaat tgtaaactgt aatattttgt taaaattcgc 5460
 gttaaatfff tgttaaatca gctcattfff taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc 5520
 ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag 5580
 tccactatta aagaacgtgg actccaactc caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga 5640
 tggcccacta cgtgaacat caccctaact aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc 5700
 actaaatcgg aaccctaaag ggagccccg atttagagct tgacggggaa agccgggttc 5760
 aatggaagca atgataaaaa aatacaata gaaaaggaaa gggaggaaat acaaaaaaat 5820
 agaagagaaa agtcatacaa agttatatac aaatgactac cccccttttt gtttttctt 5880
 aatttatttc ctttaattgaa tttcggttga actagtttga acgaattgtt agacattatt 5940
 tgccgactac cttggtgatc tcgcttttca cgtagtggac aaattcttcc aactgatctg 6000
 cgcgcgaggg caagcgatct tcttctgtc caagataagc ctgtctagct tcaagtatga 6060
 cgggctgata ctgggcccgc aggcgctcca ttgccagtc ggcagcgaca tccttcggcg 6120
 cgattttgcc ggttactgcg ctgtacaaa tgcgggacaa cgtaagcact acatttcgct 6180
 catcgccagc ccagtcgggc ggcgagttcc atagcgtaa ggtttcattt agcgcctcaa 6240
 atagatcctg ttcaggaacc ggatcaaaga gttcctccgc cgctggacct accaaggcaa 6300
 cgctatgttc tcttgctttt gtcagcaaga tagccagatc aatgtcgatc gtggctggct 6360
 cgaagatacc tgcaagaatg tcattgcgct gccattctcc aaattgcagt tcgcgcttag 6420
 ctggataacg ccacggaatg atgtcgtcgt gcacaacaat ggtgacttct acagcgcgga 6480
 gaatctcgct ctctccaggg gaagccgaag tttccaaaag gtcgttgatc aaagctcgcc 6540
 gcggtgtttc atcaagcctt acggtcaccg taaccagcaa atcaatatca ctgtgtggct 6600
 tcaggccgcc atccactgcg gagccgtaca aatgtacggc cagcaacgct ggttcgagat 6660
 ggcgctcgat gacgccaact acctctgata gttgagtcga tacttcggcg atcaccgctt 6720
 ccctcatggt aaatgaaaga aagaactaaa tactatattt cactttgagg tggaaacgta 6780
 acaatfffft ttattgtctt tataatattc atattggttt ttatcgtatt tattttatcc 6840
 atagattata aaaattcata aagaaagaca gaatgaataa actcaaatta ttacgaatag 6900
 jtctttctaa tgataaataa gtatgaattc cggcgaactg ggcgagaaag gaagggaaaga 6960
 aagcgaaggg agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca 7020
 ccacaccgca cgcgcttaat gcgccgtac agggcgcgct gcgccattcg ccattcaggg 7080
 cgcgcaactg ttgggaaggg cgatcgggtc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga 7140
 iaggggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac 7200
 jttgtaaac gacggccagt gaattgtaat acgactcact atagggcgaa ttgggtacga 7260
 iatccttccc gatacctccc aaggaaaatc tcgaatttgg atcccaaatt gacgggttag 7320
 .gtgagctta tccatgcggt tatgcactct ttgaatagga atccgttttc tgaaagatcc 7380

ES 2 381 667 T3

```

tggctttcgt actttggtgg gtctccgaga tcctttcgat gacctatggt gaagggatat 7440
ctatctaate cgatcgattg cgtaaagccc gcggtagcaa cggaaaccggg gaaagtatac 7500
agaaaagaca gttcttttct attatattag tattttctat tatattagat atattagact 7560
attatattag attagtatta gttagtgtac ccgacttagt gagtctgatg aattgttggc 7620
accagtccta cattttgtct ctgtggaccg aggagaaaag gggctcggcg ggaagaggag 7680
tgtaccatga gagaagcaag gaggtcaacc tctttcaaat atacaacatg gattctggca 7740
atgtagtggg actctcatgt cgatccgaat gaatcatcct ttccacggag gtaaatcttt 7800
gcctgctagg caagaggata gcaagttcca aattctgtct cggtaggaca tgtatttcta 7860
ttactatgaa attcataaat gaagtagtta atggtagggt taccattatc cttttgtag 7920
tgacgaatct tgtatgtggt cctaagaaaa ggaattgtc catttttcgg ggtctcaaag 7980
gggcgtggaa acgcataaga actcttgaat ggaaaagaga tgtaactcca gttccttcgg 8040
aatcggtagt caatcctatt tccgataggg gcagttgaca attgaatccg attttgacca 8100
ttattttcat atccgtaata gtgcgactgc agaagcttct aataaaaaat atatagtaat 8160
tttttattat ttattattat tttttattat taatataata aataaagtaa aatagatgac 8220
tctataaaaa tttgctcatt tttatagaaa aaaacgagta atataagccc tctttcttat 8280
ttaaagaagg cttatattgc tcgtttttta ctaaactaga tttagactaa cactaactag 8340
acccttattt atataattca tccataccat gtgtgatacc agcagctggt acaaatctta 8400
ataataccat atgatctctt ttttcattag gatcttttga taaagctgat tgtgtaccta 8460
agtaatgatt atcaggtaat aatacaggac catcaccgat aggtgtattt tgttgataat 8520
gatctgctaa ttgtactgaa ccgtcttcga tattatgtct gattttgaaa tttactttga 8580
taccattttt ttgtttatca gccatgatat atacattatg tgaattataa ttatattcta 8640
atztatgacc taagatatta ccattcttct tgaatcgat acct 8684

```

```

<210> 3
<211> 10453
<212> DNA

```

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Vector de transformación de plastos pNY2C (Ejemplo 4 II)

```

<400> 3
ctcgagtgag agaaagaagt gaggaatcct cttttcgact ctgactctcc cactccagtc 60
gttgcttttc tttctgttac ttcgaaagta gctgcttcag cttcagccac tcgaattttc 120
gatattcctt tttatttctc atcaaacgaa tggcatcttc ttctggaaat cctagctatt 180
cttagcatga tattgggaaa tctcattgct attactcaaa caagcatgaa acgtatgctt 240
gcatattcgt ccataggcca aatcggatat gtaattattg gaataattgt tggagactca 300
aatgatggat atgcaagcat gataacttat atgctgttct atatctccat gaatctagga 360
acttttgctt gcattgtatt atttggtcta cgtaccggaa ctgataacat tcgagattat 420

```

ES 2 381 667 T3

gcaggattat acacaaaaga tccttttttg gctctctctt tagccctatg tctcttatcc 480
ctaggaggtc ttctccact agcaggtttt ttcggaaaac tctatttatt ctggtgtgga 540
tggcaggcag gcctatattt cttggtttta ataggactcc ttacaagcgt tgtttctatc 600
tactattatc taaaaataat aaagtatta atgactggac gaaaccaaga aataaccctt 660
cacgtgcgaa attatagaag atccccctta agatcaaaca attccatcga attgagtatg 720
attgtatgtg tgatagcatc tactatacca ggaatatcaa tgaaccaat tattgcaatt 780
gctcaggata gcctttttta gcttctaggg tctatttctt agttcaagat ccctcttact 840
aactggaatc aaagaattag tagatctgtt ccgccccaaa tgggaatggg ctagggttat 900
gaacttataa tctgatgatc gagtcgattc catgattata agttcattcc ataccggacc 960
aggccggaat agggttatat acattctcat tatgagaagg ggtcattcgg gcctatctaa 1020
atagatacta tgtttacata gttcaatgga agcaatgata aaaaaataca aatagaaaag 1080
gaaagggagg aaatacaaaa aaatagaaga gaaaagtcac acaaagtat atacaatga 1140
ctacccccct ttttgtatth ccttaattta tttccttaat tgaatttcgg ttgaactagt 1200
ctgggagatt taatgtttta catttacttg taagcgtacc gtgacatgaa gttgttgacc 1260
tcaatcgcg tttcatatgc gccttctaca caccggccta aggctacacc agcgcgtaa 1320
ttgccacca aaaatagccc ttcgtagccc gaagacgta gagatgattt agccgtgtca 1380
aggatatcaa agtgaccaac tagaaactga ggaatggctt gaggccatac cctaactcct 1440
aatttaagtg gatcggtcga attaggctta attagcattt tcctcaaact tctgtcaact 1500
gcttccacta actcaccttc agacttggac agaattccgg tgtttgtaga cccgccaatc 1560
atgttcaaca gcaaaattct tccgggcggt gcgcgatttg gaaagagtga ggagctgtag 1620
atagttccta atgtttcaac tccttgcgtg cgtggatgca attgccccaa accctttagt 1680
tcaccatcta tcaaacattc tgttcggatt gcttctttcg ggtacgagat agatactgct 1740
gcaactggtg ggtaatatag ttttgagagt gcatttgcag cagattcaga aagagggcgc 1800
aagagaccgc ttgcaacatg agatggcacc gtcattacaa cacttttgct ctgcacggaa 1860
actaaacat ctggagtctc atatgtaag ttgtatcctc cgctctccag cttagtgata 1920
cctaagagct tccaagacaa cttactttg ctacctaact ttgcagatat tgcttctggc 1980
aacattcgaa gtcccttctt gaaagaacca actgtttggc cctgtggttt tggcagggc 2040
gggtctcgtt ctgccttggg agcgtttttc ctctctgaa ttgccttaa agtaccacct 2100
attatgcttc caccattttg ctctagtttc caaaccttc caaacgctgc tttcatgctc 2160
agttttgaag gatcaccagc ataaacacct gaacaaaacg gttcaatcag gcgctcaaaa 2220
acctcatcac cgaggttacg ccgtacaaac tctccacag attcttcacg acctggaggt 2280
gacggtcgaa tgccaagtgc accaaaacca gctctaactt tcccaccaat actcatcaaa 2340
tcaaagaacg gtaagtctgt tagcttcgat ggaaccggcc tcaatttccc attccacaac 2400
acaaaccttg gcgcagtagg atctccaac accaaatcat cttcaaacc actatctacc 2460

ES 2 381 667 T3

accatagtga gcataggatc agacggttga aaactattgg gaccttcttc ccagagaaaa 2520
 ccattctctt cagcagtgat aatgttgctt ccaacacgat ccttagcctc ggtcacaatt 2580
 aaattcggag cagcatcagg atgcttagta gcaagcgcct gagcgatgca aagaccacta 2640
 atacctccgc cgacaatcac acaatccatg aatccctccc tacaactgat tcggaattgt 2700
 ctttcttcc aaggataact tgtatccagg cgcttcagat tattagcctg gagttcgcca 2760
 ccagcagtat agccaaccct accctatcac gtcaatccca caagcctctt atccattccc 2820
 gttcgatcgt ggtgaattag cttctatgga ttctacatc attacattcc atttaggatt 2880
 aggaatacgc gtaatcggac ctgcttttta catatctcta ttgggacctt attcacctct 2940
 ttgagtgaat cgagaaatag gtttgattgt ccatcttttt gatataatc aggcattgca 3000
 ttctccgat aattcaaadc gaagcaattg gatgtccaac tcgggcctat atgacatgac 3060
 cgatcaatag atccaccttt gtcataatatt ccatacatca cactagatag atatcatatt 3120
 catggaatac gattcacttt caagatgcct tgggtggtgaa atggtagaca cgcgagactc 3180
 aaaatctcgt gctaaatagc gtggagggtc gagtcctctt caaggcataa tattgagaat 3240
 gctcattgaa tgagcattct caataagaga gctcggatcg aatcggattt gatataccga 3300
 ttcgatccga gctcttgga ttggaataaa ttcggcagcg gatcgcgaaa tcttggtgat 3360
 cttctctatc taatgaatgg ggagtccgct ttaaaatcgt ccgccctgca cccaccccc 3420
 gagtatatgc tccaacagga atcacacaag ggtagattag aaacctctgg taaaatgccc 3480
 gcccgaacc cagcagataa agtacattac atagtccagg gattggcgac ttaccattc 3540
 agtgactttg gactcggacg ttcccaaat ggggactatc gggtaaattc aatataatag 3600
 acgcctgttg gcattccagc cttccttctc ctttcagggc ctatccgaaa gagaatccag 3660
 tacttcttgg tcgtgaatat ctgaactggt tgtttgctgt tcaagaattc ttgtttaggc 3720
 agttcatacc atccatacat agtggtttga tctaagattt caattcttcc gtgtttcagc 3780
 agtaacatat tcttccatgg agctaaggct caaaatatgg aagaaacaag cgtttccacg 3840
 actctaccac ccagtcatt ctgttccact taatccctct ttcattggcca catatctttc 3900
 cggctaagga atgggaaatc tttctcctgt tacatgaatc caattttcat ttcattccggg 3960
 aaaagccatc tttttctcaa caatgtcttt gtcatttgat ccaatagcgt tccgttagat 4020
 aggaacagat ttgataaata ctgataactc tcggatagag tattagaacg gaaagatcca 4080
 ttagataatg aactgttggg tctaagccat ctctgacgat taatcaaca ttcgaagtgc 4140
 ttttcttgcg tattcttgat aaaccagcgt ttatatatag atgtaggagg gtctgtttgg 4200
 gaagtaagaa gccccttga catctcttca tctgcaaata attctcgatg tgaaaacaca 4260
 gagccagggg gctgatcttt gaataggaaa aagagtggat caattcgaat agatctacat 4320
 acaccttggg tgacacgagt atataagtca tgtatactg ttgaataaca agccttccat 4380
 tttctatctt gattttaga aaactagtgt gcttgggagt ccctgatgat taaataaacc 4440
 aagatcttac catgagggaa gcggtgatcg ccgaagtatc gactcaacta tcagaggtag 4500

ES 2 381 667 T3

ttggcgatc cgagcgccat ctcgaaccga cgttgctggc cgtacatttg tacggctccg 4560
 cagtggatgg cggcctgaag ccacacagtg atattgattt gctggttacg gtgaccgtaa 4620
 ggcttgatga aacaacgcgg cgagctttga tcaacgacct tttggaaact tcggcttccc 4680
 ctggagagag cgagattctc cgcgctgtag aagtcacat tgttggtgac gacgacatca 4740
 ttccgtggcg ttatccagct aagcgcgaac tgcaatttgg agaattggcag cgcaatgaca 4800
 ttcttgacgg tatcttcgag ccagccacga tcgacattga tctggctatc ttgctgacaa 4860
 aagcaagaga acatagcgtt gccttggtag gtccagcggc ggaggaaactc tttgatccgg 4920
 ttctgaaca ggatctattt gaggcgctaa atgaaacctt aacgctatgg aactcgccgc 4980
 ccgactgggc tggcgatgag cgaaatgtag tgcttacgtt gtcccgcatt tggtagacgg 5040
 cagtaaccgg caaaatcgcg ccgaaggatg tcgctgccga ctgggcaatg gagcgcctgc 5100
 cggcccagta tcagcccgtc atacttgaag ctgacagggc ttatcttga caagaagaag 5160
 atcgtttggc ctcgcgca gatcagttgg aagaatttgt cactacgtg aaaggcgaga 5220
 tcaccaaggt agtcggcaaa taatgtctaa caattcgtt aactagaac tagttagtgt 5280
 tagtctaaat ctagttagt aaaaaacgag caatataagc cttctttaa taagaaagag 5340
 ggcttatatt actcgtttt ttctataaaa atgagcaaat tttatagag tatcatattt 5400
 tactttattt attatattaa taataaataa taataataaa taataaaaaa ttactatata 5460
 tttttatta gaagctgggt ccaaatgaa ttggcttatt cgaaaaaggc cttgttcttt 5520
 ggaagatcta tctcgtgtt ggtactgat ggtccactc tgcaagaact ccgaatcatt 5580
 ctcttgaagc tcactctct catcataaat gatccgctt ccccgaaatg acctggacca 5640
 atagggaaat ccaattcat tggcctttc gatacaatca aatagaaagc ccaagggcg 5700
 ccatattcta ggagccaaa ctatgtgatt gaataaatcc tcctgagggt caagggctcc 5760
 ttctccctcc cttcttcaa actccgattc atatttttca tagagaaatc tctgatcaag 5820
 gatagaacaa gagccgtttt gcatcatatc taagggattc ctcggttcgg gccgaagaag 5880
 caatgtcact cgatcattat caaactgact gcaatctttt tctgtccgtg aagatcccac 5940
 cagagcgct tctacttcta ataggccatg aactagatca gaatcattct caacgagtc 6000
 ataagaagtg atcccatttt tttcatcggg tccggataaa gaccaaagat cttgagcgac 6060
 cgatccggca gaacaactca aaagataaag aagtatcgtt aatctcttca tgctcgttcc 6120
 aagctcgaag taccatttgt acaaataaga atccccttcg ttacatgatt tcttctcat 6180
 atagatagat ataggatcta tggggcaatt acttagaagt acattttgtg ctacagccct 6240
 tcctatctga tagaaaagga tccatgatc ctgaaccgat cttacctggg atcgcaaatc 6300
 ccaagtttgt ctatgaagag cggatctaat tgtattagtg tctataattg atttcttctg 6360
 tgtaacta atcgatagga cctcattggt aagtgtaca agatctcgtg cattggaacc 6420
 catggttatg gaccgaatc cgttagtatg gaacattttc tttccaagt gaaatcccct 6480
 agtatatgaa agagtgaaaa agtgctttcg ttgttggtgga agaagaagcc ttcgtatctt 6540

ES 2 381 667 T3

aatgcacgta ttttaatttat tcggagctat tagagcggga tccacttttt ggggaatatg 6600
agtcgaagca ataacaagaa tttttctagt agaacatctt tcacaatccc tggagagatg 6660
gttcactaat agaccgaggg ctaagtcatt cgactcattc acatccagat catgaatggt 6720
tggaatccat attatgcaag gagacattgc ttttgctaat tcgaattgaa gggatgata 6780
aaatcgggtct atttccggca tcatatccat agttagccca ttcaccttag ttagcagttt 6840
cagctccgta tcaaggtcac gatcgatata gtcactagca tcaagattgt cactatcatt 6900
aatatcgta ctatcatcaa tatcgatctc atcaagaaga aaaccttttag gcttggtatc 6960
caggaacttg ttcagaaata ccgtaatgaa aggaacatag gagtttgctg ctaggtattt 7020
gaccaaatag gatcgtccag ttcctataga acctatcact aaaatacccc tagaggggga 7080
taaggctaag cggagcgaag agggttttcc atgagatggg aatgaaaac tttttcccc 7140
acacgaagt tgtgaataag tgattgtctg ataatgagca aggaatatcc gtctttctgc 7200
taaacaggat ggattgaact cataattcat tagatgcttt ttatgaatgt caactaagta 7260
tcgtaagtaa attgctccc gttgttcaat catttgataa ccagagtcatt tctttgataa 7320
acgatcacta tgagtcagac tcaatagaat ttgatcaatc ctattttctg tcgtaagggt 7380
ggagaactga accaagaatt ctctttcttc atcatcaatc gaatcactgt tcgagacca 7440
ggattctatt ttatcatcaa tccaatcccc gttcacggtt tttctttttc ttatcaatga 7500
atagatctct ttacttgtat gacttagatg tctcgtattt ctcgaaaaag tgattcgatt 7560
gatgggattt ggtatgagat cgatgatctc gatgagattg atattccaat ctttcttctt 7620
agaacgtatt gatttgacc cataagcggg accaagcatg ttgccgccag aagcagaacc 7680
ccgtatttct tctagatacc taggtgagct ctggtaccct ctagtcaagg ccttaagtga 7740
gtcgtattac ggactggccg tcgttttaca acgctctgac tgggaaaacc ctggcggtac 7800
ccaacttaat cgccttgag cacatcccc tttccgcagc tggcgtaata gcgaagaggc 7860
ccgcaccgat cgccttccc aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc gcttcgcttg 7920
gtaataaagc ccgcttcggc gggctttttt ttgtaacta cgtcaggtgg cacttttcgg 7980
ggaaatgtgc gcggaacccc tttttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg 8040
ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt 8100
attcaacatt tccgtgtcgc cettattccc ttttttgcgg cattttgcct tctgttttt 8160
gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg 8220
ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg ccccgaaaga 8280
cgttctcaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtgt 8340
gacgccgggc aagagcaact cggctgcgcg atacactatt ctcaaatga cttggttgag 8400
tactcaccag tcacagaaaa gcattttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 8460
gctgccataa ccatgagtga taactctgc gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga 8520
ccgaaggagc taaccgcttt ttgcacaac atgggggatc atgtaactcg cttgatcgt 8580

tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta 8640
 gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg 8700
 caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc 8760
 cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt 8820
 atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccttcccgta tcgtagttat ctacacgacg 8880
 gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgctcactg 8940
 attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttacc 9000
 cggttgataa tcagaaaagc cccaaaaaca ggaagattgt ataagcaaat atttaaattg 9060
 taaacgtaa tattttgtta aaattcgcgt taaatTTTTg ttaaatacagc tcatttttta 9120
 accaataggc cgaaatcggc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagccc gagatagggt 9180
 tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac tccaacgtca 9240
 aagggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gccactacg tgaaccatca cccaaatcaa 9300
 gtttttggg gtcgaggtgc cgtaaagcac taaatcggaa ccctaaaggg agccccgat 9360
 ttagagcttg acggggaaag cgaacgtggc gagaaaggaa ggggaagaaag cgaaaggagc 9420
 gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggg cacgctgccc gtaaccacca caccgcccgc 9480
 gcttaatgcg ccgctacagg gcgctgaaaa ggatctaggg gaagatcctt tttgataatc 9540
 tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 9600
 agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcccgt aatctgctgc ttgcaaacia 9660
 aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc 9720
 cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgttcttcta gtgtagccgt 9780
 agttaggcca cacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgtc ctgctaatac 9840
 tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 9900
 gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaaaggg gggttcgtgc acacagccca 9960
 gcttggagcg aacgacctac accgaaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 10020
 ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 10080
 gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcttggta tctttatagt cctgtcgggt 10140
 ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat 10200
 ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcttggc cttttgctgg ccttttgctc 10260
 acatgtaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg 10320
 gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcggg taacaatttc acacaggaaa cagctatgac 10380
 catgattacg ccaagctacg taatacgact cactagtggg cagatcttcg aatgcatcgc 10440
 gcgcaccgta cgt 10453

<210> 4
 <211> 173

<212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de DNA del promotor del gen 16S PEP-NEP rRNA de plastos de maíz fusionado al sitio de fijación de ribosoma (RBS) del plasto rbcL de *N.tabacum*

<400> 4
 gaattcacca cgatcgaacg ggaatggata agaggcttgt gggattgacg tgatagggta 60
 gggttggcta tactgctggt ggcgaactcc aggctaataa tctgaagcgc ctggatacaa 120
 gttatccttg gaaggaaaga caattccgaa tcagttgtag ggagggattc atg 173

<210> 5
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador superior para amplificación del promotor del gen 16S PEP-NEP rRNA del DNA de plastos de maíz, comprendiendo el cebador un sitio de restricción EcoRI (Ejemplo 1 I). te
 ct

<400> 5
 gccagaattc accacgatcg aacgggaatg gata 34

<210> 6
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador inferior que comprende un sitio de restricción BspHI (Ejemplo 1 I).

<400> 6
 gccgtcatga atccctcctt acaactgatt cgggaattgtc tttccttcca aggataactt 60
 gtatccaggc gcttcag 77

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador superior para amplificación del gen ppo de *A. thaliana* (Ejemplo 1 II).

<400> 7
 ccacgcacgc aaggagttga 20

<210> 8
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador inferior para amplificación del gen ppo de *A. thaliana*, comprendiendo el cebador un sitio de restricción SpeI (Ejemplo 1 II).

<400> 8
 cggtactagt ctgggagatt taatggt 27

<210>	9	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador de la cadena superior para amplificación del promotor del gen psbA de <i>N. tabacum</i> , comprendiendo el cebador un sitio de restricción EcoRI (Ejemplo 1 III).	
<400>	9	
	ttaagaattc gaatagatct acata	25
<210>	10	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador de la cadena inferior para amplificación del promotor del gen psbA de <i>N. tabacum</i> , comprendiendo el cebador un sitio de restricción NcoI (Ejemplo 1 III).	
<400>	10	
	cagccatggt aaaatcttgg tt	22
<210>	11	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador superior para amplificación del promotor del gen clpP de <i>A. thaliana</i> , comprendiendo el cebador un sitio de restricción EcoRI (Ejemplo 1 V).	
<400>	11	
	gcggaattca tcattcagaa gcccgttcgt	30
<210>	12	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador inferior para amplificación del promotor del gen clpP de <i>A. thaliana</i> , comprendiendo el cebador un sitio de restricción BspHI (Ejemplo 1 V).	
<400>	12	
	gcgtcatgaa atgaaagaaa aagagaat	28
<210>	13	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador superior para amplificación de un nuevo locus diana de DNA de plastos, comprendiendo el cebador un sitio de restricción XhoI (Ejemplo 4 I).	
<400>	13	
	agttatctcg agtgagagaa agaagtgagg aat	33

ES 2 381 667 T3

<210>	14	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Cebador inferior para amplificación de un nuevo locus diana de DNA de plastos, comprendiendo el cebador un sitio de restricción XbaI (Ejemplo 4 I).	
<400>	14	
	ttctctagaa gaaatacggg g	21
<210>	15	
<211>	79	
<212>	DNA	
<213>	Bacteriófago X2 de Staphylococcus aureus	
<400>	15	
	gttaaagaat gtagctgact gcatacttaa accaccata ctagttgctg ggtgggtttt	60
	atgttataat ataaatgtg	79
<210>	16	
<211>	110	
<212>	DNA	
<213>	Bacteriófago kvpl de Kluyvera	
<400>	16	
	tctagagaca ttacgttctc cccttgagtg atacacaatg agaaccaact cgtttcaagt	60
	agtacctcac ataacttatc ttttaaatca acagaaggag attcaccatg	110
<210>	17	
<211>	97	
<212>	DNA	
<213>	Bacteriófago T3	
<400>	17	
	tctagaggga gacctcatct ttgaaatgag cgatgactaa aggttgagat cctttggttt	60
	ccctttatct ttaataactt aggagattta attcatg	97
<210>	18	
<211>	194	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia Artificial	
<220>		
<223>	Promotor quimérico X2 y gen 10 de kvp1 5; UTP	
<220>		
<221>	Característica diversa	
<222>	(1) .. (194)	
<400>	18	
	aattcgtaa agaatgtagc tgactgcata cttaaaccac ccatactagt tgctgggtgg	60
	tttttatggtt ataataataa tgtgtctaga gacattacgt tctccccttg agtgatacac	120
	aatgagaacc aactcgtttc aagtagtacc tcacataact tatcttttaa atcaacagaa	180
	ggagattcac catg	194

ES 2 381 667 T3

<210> 19
 <211> 10011
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Plásmido pEB10

<400> 19
 agcttctaataaaaaatata tagtaatttt ttattattta ttattattat ttattattaa 60
 tataataaat aaagtaaaat atgatactct ataaaaattt gctcattttt atagaaaaaa 120
 acgagtaata taagccctct ttcttattta aagaaggctt atattgctcg tttttacta 180
 aactagattt agactaacac taactagttc tagagcaatt cccgaggctg tagccgacga 240
 tgggtgcgcca ggagagttgt tgattcattg tttgcctccc tgctgcggtt tttcaccgaa 300
 gttcatgcca gtccagcgtt tttgcagcag aaaagccgcc gacttcggtt tgcggtcgcg 360
 agtgaagatc cttttcttgt taccgccaac gcgcaatatg cttgagagg tcgcaaaatc 420
 ggcgaaattc catacctgtt caccgacgac ggcgctgacg cgatcaaaga cgcggtgata 480
 catatccagc catgcacact gatactcttc actccacatg tcggtgtaca ttgagtgacg 540
 cccggctaac gtatccacgc cgtattcggg gatgataatc ggctgatgca gtttctcctg 600
 ccaggccaga agttcttttt ccagtacctt ctctgccgtt tccaaatcgc cgctttggac 660
 ataccatccg taataacggt tcaggcacag cacatcaaag agatcgctga tggatcgggt 720
 gtgagcgtcg cagaacatta cattgacgca ggtgatcgga cgcgctcgggt cgagtttacg 780
 cgttgcttcc gccagtgggc cgaaatattc ccgtgcacct tgcggacggg tatccggttc 840
 gttggcaata ctccacatca ccacgcttgg gtggtttttg tcacgcgcta tcagctcttt 900
 aatcgctgt aagtgcgctt gctgagtttc cccgttgact gcctcttcgc tgtacagttc 960
 tttcggttg ttgcccgtt cgaaaccaat gcctaaagag aggttaaagc cgacagcagc 1020
 agtttcatca atcaccacga tgccatgttc atctgcccag tcgagcatct cttcagcgta 1080
 agggtaatgc gaggtacggt aggagttggc cccaatccag tccattaatg cgtggtcgtg 1140
 caccatcagc acgttatcga atcctttgcc acgcaagtcc gcatcttcat gacgacaaa 1200
 gccagtaaag tagaacggtt tgtggttaat caggaactgt tcgcccttca ctgccactga 1260
 ccggatgccg acgcgaagcg ggtagatata acactctgtc tggcttttgg ctgtgacgca 1320
 cagttcatag agataacctt caccgggttg ccagaggtgc ggattcacca cttgcaaagt 1380
 cccgctagtg cttgtccag ttgcaaccac ctggtgatcc gcatcacgca gttcaacgct 1440
 gacatcacca ttggccacca cctgccagtc aacagacgcg tggttacagt cttgcgagc 1500
 atgcgtcacc acggtgatata cgtccacca ggtgttcggc gtggtgtaga gcattacgct 1560
 gcgatggatc ccggcatagt taaagaaatc atggaagtaa gactgctttt tcttgccgtt 1620
 ttcgtcggta atcaccatc ccggcgggat agtctgccag ttcagttcgt tgttcacaca 1680
 aacggtgata cgtacacttt tcccggcaat aacatacggc gtgacatcgg cttcaaatgg 1740

ES 2 381 667 T3

cgtatagccg ccctgatgct ccatcacttc ctgattattg acccacactt tgccgtaatg 1800
 agtgaccgca tcgaaacgca gcacgatacg ctggcctgcc caacctttcg gtataaagac 1860
 ttcgcgctga taccagacgt tgcccgcata attacgaata tctgcatcgg cgaactgatc 1920
 gttaaaactg cctggcacag caattgcccg gctttcttgt aacgcgcttt cccaccaacg 1980
 ctgatcaatt ccacagtttt cgcgatccag actgaatgcc cacaggccgt cgagtttttt 2040
 gatttcacgg gttggggttt ctacaggacg gaccatggat taaatctcct aagtatttaa 2100
 agataaaggg aaaccaaagg actccaacct ttagtcatcg ctcatttcaa agatgaggtc 2160
 tccctctacc cgggaagaga ttcggaattg tctttccttc caaggataac ttgtatccag 2220
 gcgcttcaga ttattagcct ggagttcgcc accagcagta tagccaaccc taccctatca 2280
 cgtcaatccc acaagcctct tatccattcc cgttcgatcg tggatgaattc gaatagatct 2340
 attcgaattc gttaaagaat gtagctgact gcataactaa accaccata ctagttgctg 2400
 ggtggttttt atgttataat ataatgtgt ctagagacat tacgttctcc ccttgagtga 2460
 tacacaatga gaaccaactc gtttcaagta gtacctcaca taacttatct tttaaatcaa 2520
 cagaaggaga ttcaccatgg attgtgtgat tgtcggcggg ggtattagtg gtctttgcat 2580
 cgctcaggcg cttgctacta agcatcctga tgctgctccg aatttaattg tgaccgaggc 2640
 taaggatcgt gttggaggca acattatcac tcgtgaagag aatggttttc tctgggaaga 2700
 aggtcccaat agttttcaac cgtctgatcc tatgctcact atggtggtag atagtggtt 2760
 gaaggatgat ttggtggttg gagatcctac tgcgccaaagg tttgtggtgt ggaatgggaa 2820
 attgaggccg gttccatcga agctaacaga cttaccgttc tttgatttga tgagtattgg 2880
 tgggaagatt agagctggtt ttggtgcact tggcattcga ccgtcacctc caggctcgtga 2940
 agaatctgtg gaggagtgtg tacggcgtaa cctcggatgat gagggttttg agcgcctgat 3000
 tgaaccgttt tgttcagggtg tttatgctgg tgatccttca aaactgagca tgaaagcagc 3060
 gtttgggaag gtttggaaac tagagcaaaa tgggtggaagc ataatagggtg gtacttttaa 3120
 ggcaattcag gagagggaaa acgctcccaa ggcagaacga gaccgcgcc tgccaaaacc 3180
 acagggccaa acagttggtt ctttcaggaa gggacttcga atgttgccag aagcaatctc 3240
 tgcaagatta ggtagcaaag ttaagttgtc ttggaagctc ttaggtatca ctaagctgga 3300
 gagcggagga tacaactaa catatgagac tccagatggt ttagtttccg tgcagagcaa 3360
 aagtgttga atgacggtgc catctcatgt tgcaagcggg ctcttgccc ctctttctga 3420
 atctgctgca aatgactct caaaactata ttaccacca gttgcagcag tatctatctc 3480
 gtaccggaaa gaagcaatcc gaacagaatg tttgatagat ggtgaactaa agggttttgg 3540
 gcaattgcat ccacgcacgc aaggagttga aacattagga actatctaca gtcctcact 3600
 ctttccaaat cgcgcaccgc ccggaagaat tttgctggtg aacatgattg gcgggtctac 3660
 aaacaccgga attctgtcca agtctgaagg tgagttagtg gaagcagttg acagagattt 3720
 gaggaaaatg ctaattaagc ctaattcgac cgatccactt aaattaggag ttagggatg 3780

ES 2 381 667 T3

gcctcaagcc attcctcagt ttctagttgg tcactttgat atccttgaca cggctaaatc 3840
atctctaacg tcttcgggct acgaagggtc atttttgggt ggcaattacg tcgctgggtg 3900
agccttaggc cgggtgtgtag aaggcgcata tgaaaccgcg attgaggcca acaacttcat 3960
gtcacggtac gcttacaagt aaatgtaaaa cattaatctt cccagactag ttcaaccgaa 4020
attcaattaa ggaaataaat taaggaaata caaaaagggg ggtagtcatt tgtatataac 4080
tttgtatgac ttttctcttc tatttttttg tatttctctc ctttctttt ctatttgtat 4140
ttttttatca ttgcttccat tgaactgcag aaagaaggcc cggctccaag ttgttcaaga 4200
atagtggcgt tgagtttctc gaccctttga cttaggatta gtcagttcta tttctcgatg 4260
gggcggggaa gggatataac tcagcggtag agtgtcacct tgacgtgggtg gaagtcatca 4320
gttcgagcct gattatccct aagcccaatg tgagtttttc tagttggatt tgctccccg 4380
ccgtcgttca atgagaatgg ataagaggct cgtgggattg acgtgagggg gcagggatgg 4440
ctatatttct gggagcgaac tccgggcgaa tatgaagcgc atggatacaa gttatgcctt 4500
ggaatgaaag acaattccga atccgctttg tctacgaaca aggaagctat aagtaatgca 4560
actatgaatc tcatggagag ttcgatcctg gctcaggatg aacgctggcg gcatgcttaa 4620
cacatgcaag tcggacggga agtggtgttt ccagtgccgg acgggtgagt aacgcgtaag 4680
aacctgccct tgggagggga acaacagctg gaaacggctg ctaatacccc gtaggctgag 4740
gagcaaaagg aggaatccgc ccgaggaggg gctcgcgtct gattagctag ttggtgaggc 4800
aatagcttac caaggcgatg atcagtagct ggtccgagag gatgatcagc cacttgagg 4860
ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtggtg gaattttccg caatgggcga 4920
aagcctgacg gagcaatgcc gcgtggaggg agaaggccca cgggtcgtga acttcttttc 4980
ccggagaaga agcaatgacg gtatctgggg aataagcatc ggctaactct gtgccagcag 5040
ccgcggtaat acagaggatg caagcgttat ccggaatgat tgggcgcggc ggtggagctc 5100
cagcttttgt tccctttagt gaggttaat ttcgagcttg gcgtaatcat ggtcatagct 5160
gtttcctgtg tgaaattggt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat 5220
aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaagagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc 5280
actgcccgtc ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg 5340
cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg ctcttcgctc tctcgcctca ctgactcgtc 5400
gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt 5460
atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc 5520
caggaaccgt aaaaaggccg cgttgcgtgc gtttttccat aggtccgcc cccctgacga 5580
gcatcaciaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata 5640
ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac 5700
cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg 5760
taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc 5820

ES 2 381 667 T3

cgttcagccc gaccgctgcg cttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag 5880
 acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt 5940
 aggcggtgct acagagttct tgaagtggg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt 6000
 atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aanagagttg gtagctcttg 6060
 atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac 6120
 gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca 6180
 gtggaacgaa aactcacggt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac 6240
 ctagatcctt ttaaattaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac 6300
 ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt 6360
 tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt 6420
 accatctggc cccagtgtg caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg ctccagatgt 6480
 atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc 6540
 cgctccatc cagtctatta attggtgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa 6600
 tagtttgcc aacgttggtt ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgctgtttg 6660
 tatggcttca ttcagctccg gttccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatggt 6720
 gtgcaaaaaa gcggttagct cttcgggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc 6780
 agtgttatca ctcatggta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt 6840
 aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg 6900
 gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac 6960
 tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc 7020
 gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcacc aactgatctt cagcatcttt 7080
 tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaatgccc caaaaaagg 7140
 aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactctt ctttttcaat attattgaag 7200
 catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa 7260
 acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc cctgggaaat tgtaaacggt 7320
 aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaata gctcattttt taaccaatag 7380
 gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt 7440
 gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga 7500
 aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaacat caccctaate agttttttg 7560
 gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag ggagccccg atttagagct 7620
 tgacggggaa agccggttca atggaagcaa tgataaaaa atacaaatag aaaaggaaag 7680
 ggaggaaata caaaaaata gaagagaaaa gtcatacaa gttatataca atgactacc 7740
 cccctttttg tatttcctta atttatttcc ttaattgaat ttcggttgaa ctagtgtgaa 7800
 cgaattgta gacattattt gccgactacc ttggtgatct cgctttcac gtagtggaca 7860

ES 2 381 667 T3

aattcttcca actgatctgc gcgcgaggcc aagcgatctt cttcttgtcc aagataagcc 7920
tgtctagctt caagtatgac gggctgatac tgggccggca ggcgctccat tgcccagtcg 7980
gcagcgacat ccttcggcgc gattttgccc gttactgcmc tgtaccaaat gcgggacaac 8040
gtaagcacta catttcgctc atcgccagcc cagtcgggcg gcgagttcca tagcgttaag 8100
gtttcattta gcgectcaaa tagatcctgt tcaggaaccg gatcaaagag ttccctccgcc 8160
gctggaccta ccaaggcaac gctatgttct cttgcttttg tcagcaagat agccagatca 8220
atgtcgatcg tggctggctc gaagatacct gcaagaatgt cattgcgctg ccattctcca 8280
aattgcagtt cgcgcttagc tggataacgc cacggaatga tgtcgtcgtg cacaacaatg 8340
gtgacttcta cagcgcggag aatctcgcctc tctccagggg aagccgaagt ttccaaaagg 8400
tcgttgatca aagctcgcgc cgttgtttca tcaagcctta cggtcaccgt aaccagcaaa 8460
tcaatatcac tgtgtggctt caggccgcca tccactgcmc agccgtacaa atgtacggcc 8520
agcaacgctc gttcgagatg gcgctcgatg acgccaacta cctctgatag ttgagtcgat 8580
acttcggcga tcaccgcttc cctcatggta aatgaaagaa agaactaaat actatatttc 8640
actttgaggt ggaacgtaa caattttttt tattgtcttt ataatttca tattggtttt 8700
tatcgtatth attttatcca tagattataa aaattcataa agaaagacag aatgaataaa 8760
ctcaaattat tacgaatagg tctttctaag gataaataag tatgaattcg gcgaacgtgg 8820
cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag cgggcmctag ggcgctggca agtgtagcmg 8880
tcacgctcmc cgtaaccacc acaccgcmc cgcttaatgc gccgctacag ggcgcmctcm 8940
gccattcmcc attcaggctg cgcactgtt gggaaagggc atcggtgcmc gcctctcmcc 9000
tattaccmca gctggcmgaa gggggatgtg cmgcaagcmc attaagttgg gtaacmccag 9060
ggttttccca gtcacgacgt tgtaaaacga cmgcccagtg attgtaatac gactcactat 9120
agggcmgaatt gggtagmga tctttccmga tacttcccaa ggaaaatctc gaatttggat 9180
cccaaattga cmgggttagtg tgagcttatc catgcmgtta tgcactcttt gaataggaat 9240
cmgtttctg aaagatcmct gctttcmgtc tttgggtgggt ctmcgagatc cttcmgatga 9300
cctatgttga agggatatct atctaaccg atcmgttcmg taaagcmcmg ggtagcaacg 9360
gaaccmggga aagtatacmg aaaagacmgt tctttctat tatattagta tttctatta 9420
tattagatat attagactat tatattagat tagtattagt tagtgatccc gacttagtga 9480
gtctgatgaa ttgttggcac cagtcctaca tttgtctct gttgaccmga gagaaaaggg 9540
gctcmgcmgg aagaggmgtg taccatgaga gaagcaagga ggtcaacctc tttcaaatat 9600
acaacatmga ttctmgaat gtagttmga tctcatmctg atccgaatga atcatcmctt 9660
ccacmgaaggt aaatctttg cmgttagmca agaggatagc aagttccaaa ttctmctcmg 9720
gtaggacatg ttttctatt actatgaaat tcataaatga agtagttaat ggtagmgtta 9780
ccattatcmct tttttagtg acgaatcttg tatgttctc taagaaaagm aatttgmcca 9840
ttttcmggg tctcaagmga cmgtmgaac gcataagaac tcttgaatgm aaaagmgtg 9900

ES 2 381 667 T3

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

<210> 20
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**
 <220>
 <223> Cebador de la cadena superior

<220>
 <221> Característica diversa
 <222> (1) .. (34)

<400> 20
 gccagaattc accacgatcg aacgggaatg gata 34

<210> 21
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <223> Cebador de la cadena inferior de 16S NEP-PEP de maíz

<220>
 <221> Característica diversa
 <222> (1) .. (28)

<400> 21
 ctctagagat tcggaattgt ctttcctt 28

<210> 22
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <223> Cebador de la cadena superior de la 5'UTR del gen del bacteriófago T3

<220>
 <221> Característica diversa
 <222> (1) .. (37)

<400> 22
 gaagatgcca tggattaaat ctcctaagtt attaaag 37

<210> 23
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> **Secuencia Artificial**

<220>
 <223> Cebador de la cadena inferior de la 5'UTR del gen del bacteriófago T3

<220>
 <221> Característica diversa

<222> (1)..(37)

<400> 23
 cgaatctctt cccgggtaga gggagacctc atctttg 37

<210> 24
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador de la cadena superior 16S NEP-PEP de maíz (RTK38)

<220>
 <221> Característica diversa
 <222> (1)..(38)

<400> 24
 ctccctctac ccggaagag attcgaatt gtctttcc 38

<210> 25
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador de la cadena inferior (RTK37)

<220>
 <221> Característica diversa
 <222> (1)..(38)

<400> 25
 cgcttagtca tgataaaatc ttggtttatt taatcatc 38

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

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

<210> 27
 <211> 85
 <212> DNA
 <213> Bacteriófago X2

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

<210> 28
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 381 667 T3

<223> Cebador de la cadena superior, 5'UTR del gen 10 de kpV1

<220>

<221> Característica diversa

<222> (1) .. (28)

<400> 28

gttctagaga cattacgttc tccccttg

28

<210> 29

<211> 29

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de la cadena inferior , 5'UTR del gen 10 de kpV1

<220>

<221> Característica diversa

<222> (1) .. (29)

<400> 29

agatatccat ggtgaatctc ctggtgatt

29

REIVINDICACIONES

1. Un método para protección de una planta transplastómica que comprende los pasos de:
- 5 a) Introducir el un plasto de una célula vegetal un vector de transformación de plastos que comprende dos constructos marcadores seleccionables distintos, en donde el primer constructo comprende un promotor funcional en un plasto de célula vegetal y una región de terminación de la transcripción funcional en un plasto de célula vegetal enlazada operativamente a un primer marcador seleccionable que confiere resistencia a un compuesto selectivo no letal, y el segundo constructo comprende un promotor funcional en un plasto de célula vegetal y una región de terminación
- 10 de la transcripción funcional en un plasto de célula vegetal enlazada operativamente a un segundo marcador seleccionable que confiere tolerancia a un compuesto letal,
- en donde el primer constructo marcador seleccionable está presente en la secuencia de la cadena principal del vector, y el segundo constructo marcador seleccionable está flanqueado por secuencias de ácido nucleico que son
- 15 homólogas a secuencias de ácido nucleico diana de plastos no esenciales;
- b) poner la célula vegetal en un primer medio de cultivo que comprende un compuesto no letal para el plasto al cual confiere resistencia el primer marcador seleccionable, durante 1) un periodo de aproximadamente 2 semanas o 2) hasta que aparecen brotes en un callo formado a partir de la célula vegetal; y
- 20 c) poner la célula vegetal en un segundo medio de cultivo que comprende un compuesto letal para el plasto al cual confiere resistencia el segundo marcador seleccionable durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la célula vegetal sea homoplásmica para el marcador letal; y
- 25 d) obtener una planta transplastómica que comprende únicamente el segundo marcador, letal.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el vector de transformación de plastos comprende adicionalmente uno o más constructos de productos génicos de interés expresables en plastos adyacentes al marcador letal.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el marcador letal y el constructo génico o constructos génicos
- 30 están organizados como un gen policistrónico semejante a un operón.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el marcador no letal es un gen de resistencia a antibióticos.
5. El método de la reivindicación 4, en donde el gen de resistencia a antibióticos es aadA y el compuesto selectivo no letal es espectinomina o estreptomina.
- 35 6. El método de la reivindicación 1, en donde el marcador letal es un gen de tolerancia a los herbicidas.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el gen de tolerancia a los herbicidas es una forma mutada de una protoporfirinógeno-oxidasa y el compuesto selectivo letal es butafenacil o Fórmula XVII.
- 40 8. El método de la reivindicación 1, en donde dicho vector de transformación de plastos comprende SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 19.
9. Un vector de transformación de plastos que comprende un marcador no letal que está presente en la secuencia de la cadena principal del vector, y un marcador letal flanqueado por secuencias que son homólogas a secuencias de DNA de plastos no esenciales.
- 45 10. El vector de transformación de plastos de la reivindicación 9, que comprende SEQ ID NO: 1 cuando el marcador no letal está presente en la cadena principal del vector.
- 50 11. Un vector de transformación de plastos que comprende un marcador no letal que está presente en la secuencia de la cadena principal del vector, y un marcador letal adyacente a uno o más constructos de productos génicos de interés expresables en plastos flanqueados por secuencias que son homólogas a secuencias de DNA de plastos no esenciales, en donde el marcador letal y el constructo génico o constructos génicos tienen promotores diferentes
- 55 funcionales en plastos y se expresan independientemente, o en donde el marcador letal y el constructo génico o constructos génicos están organizados como un gen policistrónico semejante a un operón.
12. El vector de transformación de plastos de la reivindicación 11, que comprende SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 19.

Figura 1

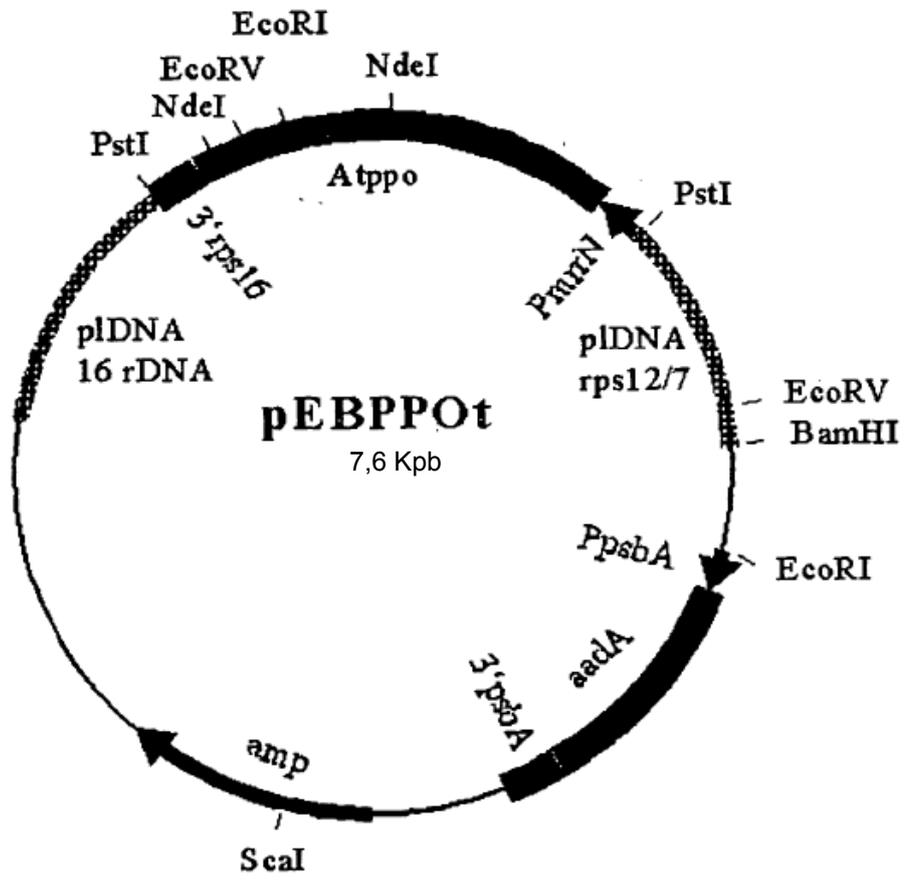


Figura 2

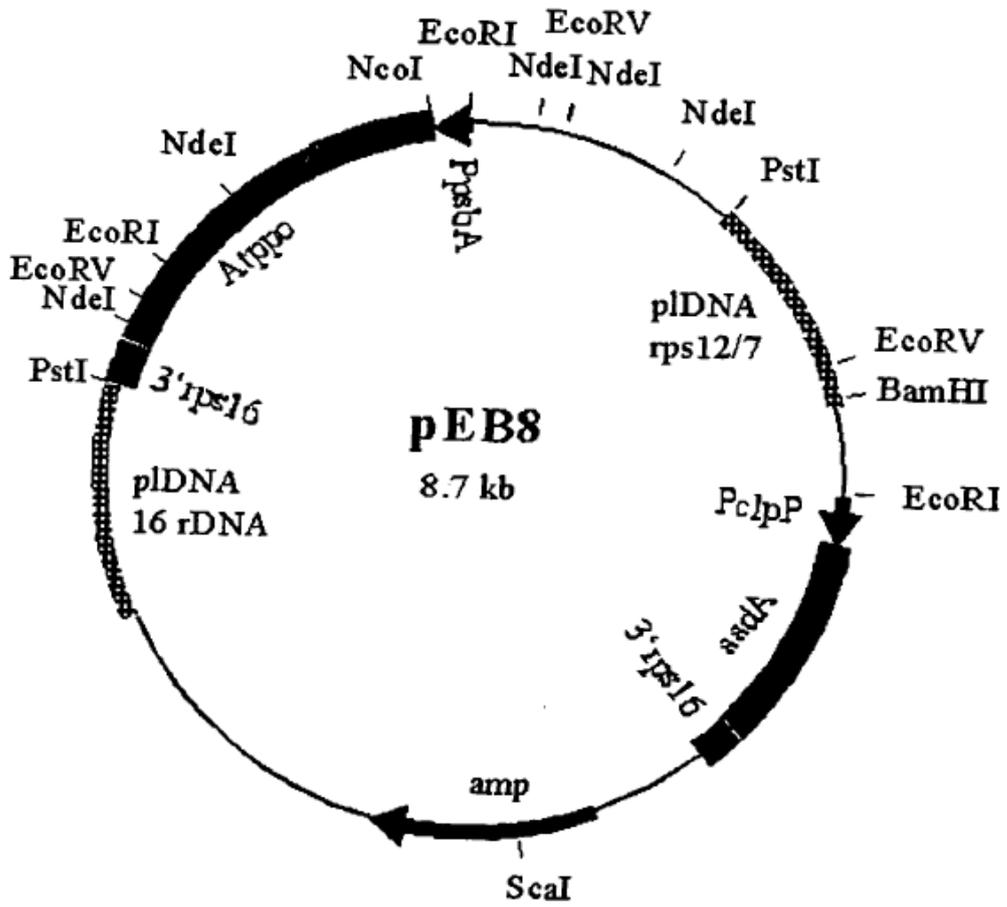


Figura 3

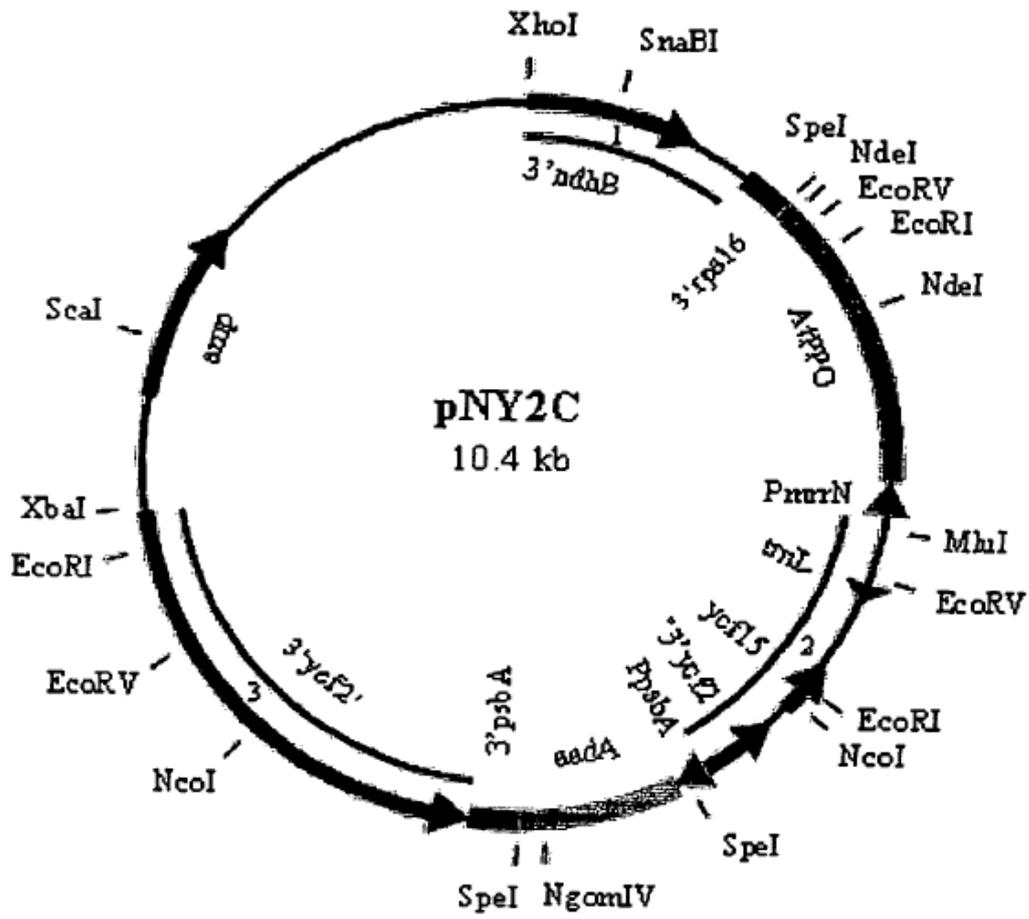


Figura 4

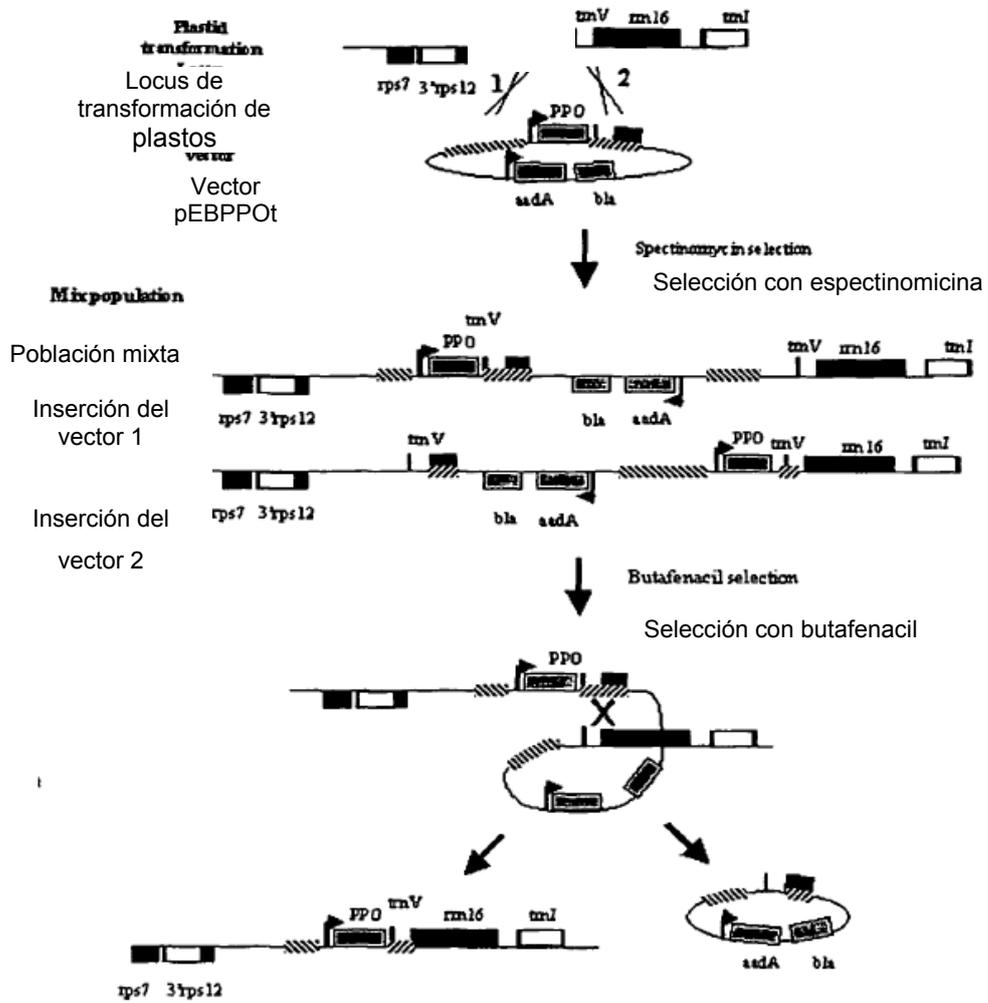


Figura 5

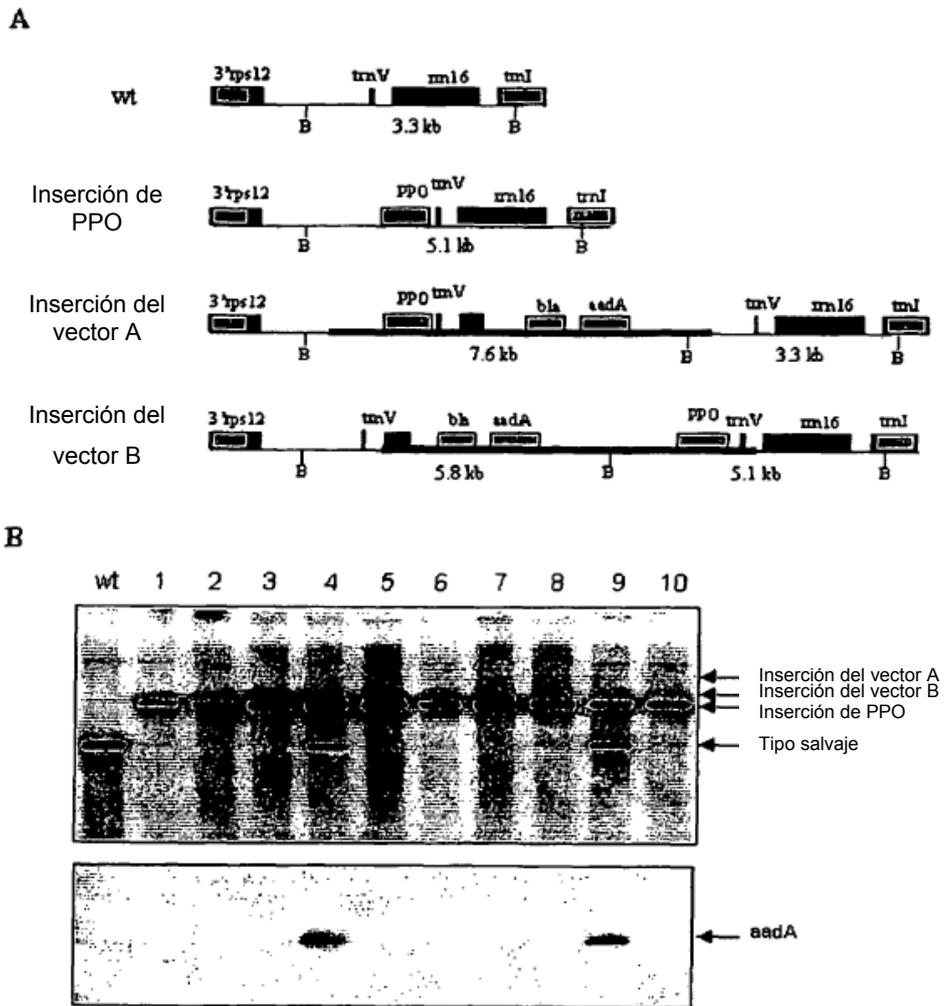


Figura 6

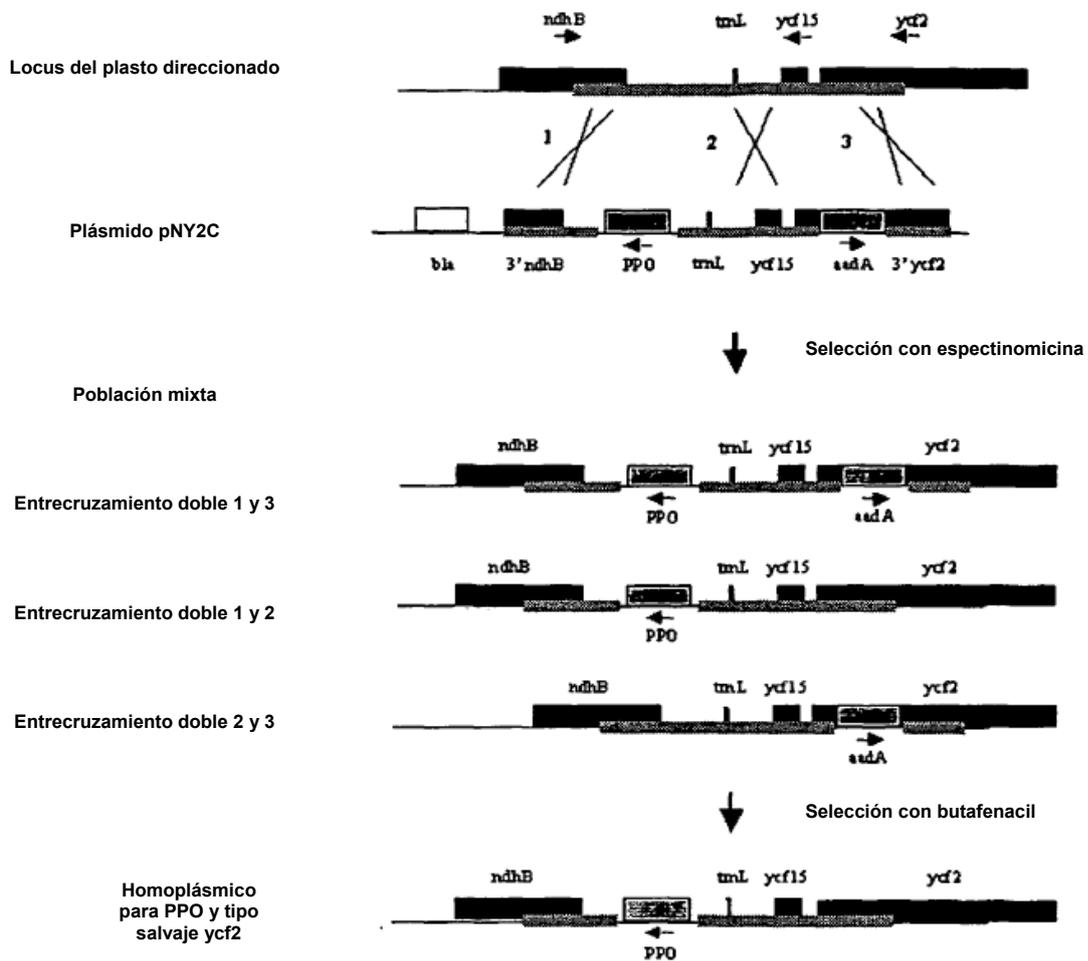


Figura 7

