

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 656**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2009 PCT/GB2009/002755**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2010 WO10061187**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2009 E 09795513 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2367941**

54 Título: **Método para transformación de mitocondria de células vegetales**

30 Prioridad:

25.11.2008 GB 0821515

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.05.2017

73 Titular/es:

**ALGENTECH SAS (100.0%)
Pépinière Genepole Enterprise 4, rue Pierre
Fontaine
91000 Evry Cedex 58, FR**

72 Inventor/es:

**MALCUIT, ISABELLE y
SOROKIN, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 611 656 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

Método para transformación de mitocondria de células vegetales

5 La presente invención se relaciona con un método para producir una especie de ARN heterólogo o exógeno en material de célula vegetal tal como células vegetales transformadas genéticamente en cultivo, tejido vegetal y plantas derivadas de células vegetales transformadas genéticamente. En particular, el método se relaciona con un método más eficiente para producir especies de ARN y/o proteínas heterólogas o exógenas en la mitocondria comprendida en el material de célula vegetal, el material genético requerido del mismo, tal como ADN y ARN, vectores, células anfitrionas, métodos de introducción de material genético en células vegetales, células vegetales que comprenden mitocondrias modificadas genéticamente, mitocondrias modificadas genéticamente y usos de las mismas.

15 Una desventaja de los métodos de transformación de mitocondrias vegetales de la técnica anterior es que la eficiencia de transformación en términos de números de mitocondrias por célula transformadas tiende a ser baja. Adicionalmente, la cantidad de proteína exógena expresada desde la mitocondria tiende a ser baja como la cantidad de proteína exógena producida por la célula. Una desventaja adicional de los métodos de la técnica anterior es que el suministro de la información genética en las mitocondrias tiende a ser errático en el sentido de que los mecanismos de suministro empleados dependen de la oportunidad para el suministro exitoso de la información genética, tal como ARN, en el genoma mitocondrial. Los métodos de la técnica anterior no se basan en procedimientos celulares endógenos eficientes para la transferencia de ARN en el genoma mitocondrial, transcripción inversa posterior y recombinación de la misma dentro del genoma mitocondrial, y cuando sea apropiado, seguido por la expresión de la proteína de interés de la misma. Como tal, los procedimientos de la técnica anterior para modificar genéticamente la mitocondria son en general ineficaces. Estas y otras desventajas de la tecnología de transformación de mitocondrias de la técnica anterior serán evidentes a partir de la descripción anterior.

25 La tesis de Holger Loos ('Transformation der Plastiden und Mitochondrien bei höheren Pflanzen – Selektive Marker und Einsatzmöglichkeiten', Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilian-Universität München, 2 abril 2004) enseña el suministro de un casete de transgén a sólo muy pocas mitocondrias del número total de mitocondrias presentes en una célula vegetal.

30 Los presentes inventores han encontrado que al utilizar o adaptar los procedimientos celulares endógenos para la transferencia de secuencias de polinucleótidos, tales como ARN, desde el citoplasma hasta la mitocondria en la célula vegetal, las secuencias de polinucleótidos derivadas de la transformación nuclear del núcleo de una célula vegetal se pueden transferir o dirigir de manera eficiente al genoma mitocondrial dentro de una célula vegetal que se transforma de esta manera, y se expresa de manera más eficiente en la mitocondria como se describe aquí. Adicionalmente, es evidente que una vez que la mitocondria se transforma con secuencias de la invención, no es necesario que se requieran transgenes codificados nucleares para la transformación inicial de las mitocondrias que permanecen en el genoma nuclear. Como consecuencia, se pueden eliminar los transgenes codificados nucleares a través de segregación deliberada o natural en las siguientes generaciones de plantas. Para los propósitos de la presente invención los términos "mitocondria" y "mitocondrias" y "población de mitocondrias" se utilizan de forma intercambiable, como lo son los términos "célula vegetal" y "células vegetales", a menos que el contexto demande lo contrario. Al emplear o adaptar los procedimientos celulares endógenos para la transferencia de ARN derivado de las secuencias de polinucleótidos introducidas al núcleo en el genoma mitocondrial, como se describe aquí, el método de la invención se considera que es único sobre los métodos de la técnica anterior para la generación de células vegetales o plantas que poseen mitocondrias genéticamente modificadas. La población de mitocondrias de la célula vegetal se bombardea constantemente mediante ARN que se deriva del núcleo de la célula, que se lleva a cabo a través de la membrana mitocondrial y en la matriz mitocondrial donde se transcribe de forma inversa, se integra en el genoma y luego se transcribe, lo que resulta en la generación de ARN a partir del cual se pueden expresar las proteínas de interés.

50 Subsiste la necesidad de un método más eficiente de transformación de mitocondrias para la producción de ARNs, y cuando se requiera, las proteínas de interés en la mitocondria en células vegetales transformadas y tejido vegetal derivado de estas. Adicionalmente, subsiste la necesidad de una tecnología a base de ácido nucleico más eficiente, por ejemplo, una tecnología con base en ARN para modificar los genes ubicados dentro de las mitocondrias.

55 La base para la presente invención, que no parece haber sido realizada en la técnica anterior, es el suministro de un sistema de transformación mitocondrial que comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican: i) una unidad de transformación de mitocondrias vegetales (MTU); ii) una transcriptasa inversa fusionada a una secuencia de péptidos de tránsito de mitocondria derivada de planta; y iii) una proteína de unión a ARN fusionada a un péptido de tránsito de mitocondria derivada de planta. Dichos sistemas de fusión mitocondrial no parecen haber sido descritos ni aludidos en la técnica anterior. Las modificaciones simplificadas adicionales de este tipo de unidad de transformación de mitocondria incluyen aquellas que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican i) una unidad de transformación de mitocondria (MTU; una secuencia de translocación de mitocondrias (MTS-5'), fusionada al extremo 5' de la MTU; una secuencia de translocación de mitocondrias (MTS-3') adicional fusionada al extremo 3' de la MTU, y un dominio de unión de cebador diseñado para la transcripción inversa en las mitocondrias utilizando tARN-Met de mitocondria (PBD-MIT). Al colocar el PBD-MIT próximo al extremo 3' de la MTS-3', es decir, fuera del intrón LtrB como se representa en la figura 8(A), la proteína LtrA es capaz de funcionar como una proteína de translocación y como una fuente de

transcriptasa inversa. En dicha variante, no subsiste la necesidad de introducir un segundo gen para la funcionalidad de transcriptasa inversa. En una segunda variante de este sistema, en la que el PBD (PBD-CYT) se diseña para interactuar con tARN-Met endógeno citoplásmico, el PBD se puede ubicar adyacente al extremo 3' de la MTU y una secuencia de translocación de mitocondrias se fusiona a este en dirección 3'. En esta segunda variante, cuando se emplea un PBD que es capaz de unirse con el tARN-Met citoplásmico como cebador, se inicia la transcripción inversa mediante la transcriptasa inversa endógena en el citoplasma utilizando tARN-Met citoplásmico. Por lo tanto, la segunda variante del sistema no requiere el cosuministro de una secuencia de ácidos nucleicos de transcriptasa inversa a la mitocondria. El uso de dichos sistemas de transformación mitocondrial proporciona un rendimiento mejorado del ARN o de la proteína de interés (dependiendo del diseño), a partir de fuentes mitocondriales que hasta ahora se pueden alcanzar en la técnica anterior. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para transformar una célula vegetal de acuerdo con la reivindicación 1.

Preferiblemente, la planta obtenida de acuerdo con el método anterior se hace crecer bajo condiciones en las que dicha especie de ARN heterólogo o exógeno codificado por el transgén integrado en la mitocondria se expresa como proteína heteróloga o exógena.

Naturalmente, el experto en la técnica entenderá que el promotor nuclear vegetal se liga operablemente a las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas aquí para accionar la expresión de dichas secuencias en el núcleo vegetal.

El "casete del transgén de mitocondria vegetal" comprende una secuencia de flanco izquierda (LFS) y una secuencia de flanco derecha (RFS) que se utilizan para recombinación homóloga del casete en el genoma mitocondrial. Entre la LFS y RFS se ubica por lo menos una secuencia promotora específica de mitocondrias (mPRO) y por lo menos una secuencia terminadora específica de mitocondrias (mTER) que a su vez flanquea por lo menos un gen aislado o secuencia de ácidos nucleicos aislada de interés, tal como una secuencia de ADN recombinante (por ejemplo, cADN) o una secuencia de ADN natural introducida. La LFS y RFS pueden incluir las secuencias de mPRO y mTER respectivamente, si por ejemplo, el ácido nucleico aislado de interés se fusiona a un ácido nucleico mitocondrial natural de interés. Por lo tanto, la secuencia promotora y terminadora no necesariamente se incluyen en la LFS o RFS respectivamente per se, o entre la LFS y RFS si se inserta un transgén en el genoma mitocondrial como una unidad de cistrón o si se fusiona traduccionalmente un transgén a un gen natural. En tal caso, cuando un transgén se fusiona a una secuencia de codificación mitocondrial natural es después de que el evento de transformación ha tenido lugar que el promotor se puede encontrar en dirección 5' de la secuencia que es homóloga a la LFS en el genoma mitocondrial y está disponible para accionar la expresión del gen fusionado al transgén de interés. Para los propósitos de la presente invención el "transgén" incluye secuencias de ácidos nucleicos aisladas que por último pueden dar lugar a la expresión de proteínas o péptidos de interés en la mitocondria como se describe aquí. Por lo tanto, la secuencia de ácidos nucleicos aislada puede ser una que da lugar a una secuencia de ARN de interés que no puede codificar o dar lugar a la expresión de un producto traducible, o la secuencia de ácidos nucleicos aislada puede dar lugar a una secuencia de ARN que codifica o da lugar a la expresión de un producto traducible tal como una proteína o péptido de interés. El experto en la técnica también apreciará que el transgén que se lleva en el ácido nucleico aislado también se puede diseñar para dar lugar a una secuencia de ARN que da lugar a la expresión de un producto o productos traducibles, y ARN no traducible. Dichos ARN que no dan lugar a la expresión de proteínas pueden dar lugar a secuencias de ARN que contienen eliminaciones u otras mutaciones y estos pueden encontrar uso como herramientas de investigación para estudiar la función de los genes en la mitocondria. Cuando el "transgén" da lugar a la expresión de proteínas o péptidos, los transgenes adecuados de interés incluyen proteínas vegetales capaces de conferir las características deseadas a cultivos vegetales y proteínas farmacéuticas para uso en mamíferos, que incluyen el hombre, tales como insulina, proinsulina, proinsulina, glucagón, interferones tales como α -interferón, β -interferón, γ -interferón, factores de coagulación sanguínea seleccionados de Factor VII, VIII, IX, X, XI, y XII, hormonas de fertilidad, que incluyen la hormona luteinizante, factores de crecimiento de hormona que estimula el folículo, que incluyen factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor estimulante de colonias de granulocitos y similares, prolactina, oxitocina, hormona estimulante de tiroides, hormona adrenocorticotrópica, calcitonina, hormona paratiroidea, somatostatina, eritropoyetina (EPO), enzimas tales como la β -glucocerebrosidasa, hemoglobina, albúmina de suero, colágeno, proteínas de estrés biótico y abiótico, tales como insecticida y proteínas tóxicas para insectos, por ejemplo de, o derivadas de *Bacillus thuringiensis*, proteínas nematocidas, proteínas con resistencia a herbicidas (por ejemplo, a glifosato), proteínas con tolerancia a la sal, proteínas con tolerancia a la sequía, proteínas o moléculas de ARN que son capaces de conferir esterilidad masculina citoplásmica a las líneas de reproducción vegetal; proteínas de mejora nutricional implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos, almidones, azúcares, alcaloides, vitaminas y vacunas comestibles, y similares. Adicionalmente, el método de la invención se puede utilizar para la producción de anticuerpos monoclonales específicos o fragmentos activos de los mismos y de enzimas industriales o fragmentos activos de las mismas.

Todas las proteínas mencionadas anteriormente son del tipo humano y vegetal. Otras proteínas que se contemplan para producción en la presente invención incluyen proteínas para uso en veterinaria y pueden corresponder a homólogos animales de proteínas humanas, tal como las proteínas humanas mencionadas anteriormente.

Se proporcionan péptidos y proteínas adecuados y ácidos nucleicos de interés aquí. Determinados ácidos nucleicos heterólogos de interés son útiles en conferir esterilidad masculina citoplásmica a líneas de reproducción vegetal (por

ejemplo, la secuencia pcf mitocondria petunia (Nivison and Hanson, Plant Cell 1989 Nov; 1 (11): 1121-30), el ORF79 de BORO-II RICE (Wang et al, 2006; Plant Cell 2006 Mar; 18 (3): 676-87 Epub 2006 Feb 17.), la secuencia orf107 de sorgo (Tang et al, Plant J. 1996. Jul; 10 (1): 123-33); la secuencia de T-urf13 de maíz (Dewey et al., EMBO J 1987 Jun; 6 (6): 1541-1546)

5 Los LFS y RFS se pueden seleccionar a partir de cualesquiera secuencias de nucleótidos que se pueden utilizar para recombinación homóloga en la mitocondria. Ejemplos adecuados incluyen secuencias codificantes tal como la secuencia de codificación para ATP6, ATP9, NAD1, NAD3, de tabaco, Arabidopsis, y arroz, (Sugiyama et al., Mol Gen Genomics (2005) 272: 603-615; Unseld et al., (1997) Nat. Genet. 15 (1), 57-61; Notsu et al., Mol. Genet. Genomics 268 (4), 434-445 (2002), ATP1, ATP9 de trigo (Ogihara et al, 2005, Nucleic Acids Res, 33 (19): 6235-6250) ATP6, ATP9 de brassica napus (s) (Handa, 2003, Nucleic Acids Res. 31(20),5907-5916) y regiones intergenicas no codificantes de tabaco, Arabidopsis, mitocondria de arroz (sugiyama et al., Mol Gen Genomics (2005) 272: 603-615; Unseld et al., (1997) Nat. Genet. 15 (1), 57-61; Notsu et al., Mol. Genet. Genomics 268 (4), 434-445 (2002).

15 El mPRO y mTER se pueden seleccionar de cualesquiera secuencias de nucleótidos promotoras mitocondriales y cualesquiera secuencias de nucleótidos terminadores mitocondriales conocidas en la técnica. Ejemplos adecuados incluyen las secuencias no traducidas en la dirección 5' ATP6, ATP9, Cob, rrn18, Rps13, Rps19, cox3, nad6, Nad9 (región promotora) de mitocondria de tabaco (Sugiyama et al., 2004, Mol Gen Genomics (2005) 272: 603-615) y Arabidopsis Mitocondria (Unseld et al, (1997). Nat Genet 15 (1), 57-61 y secuencia no traducida en dirección 3' ATP6, ATP9, Nad6, Nad9 (secuencia terminadora de mitocondrias) de mitocondria de tabaco (Sugiyama et al, 2004, Mol Gen Genomics (2005) 272: 603-615) y Arabidopsis Mitocondria (Unseld et al, (1997.) Nat Genet 15 (1), 57-61)

25 El casete transgén de mitocondria vegetal también comprende un dominio de unión de cebador (PBD) que una vez dentro de la mitocondria es capaz de capturar los tARN como cebadores para formar el ARN plantilla para iniciar la transcripción inversa de las unidades de transformación de mitocondria vegetal de la invención. El tARN adecuado para uso en la presente invención como un cebador es tARN-fMet que forma un ARN plantilla listo para transcripción inversa. El experto en la técnica apreciará que los PBD se encuentran en la naturaleza en retroelementos que incluyen retrovirus y retrotransposones. Los PBD comprenden dominios ARN específicos que hibridan a secuencias específicas en moléculas de tARN. Los tARN propiamente dichos no sirven como un PBD si no como un cebador para transcripción inversa, la plantilla para transcripción inversa es la molécula de ARN que lleva un PBD. Los PBD novedosos se pueden diseñar mediante ingeniería fácilmente que pueden hibridar a otros tARN, por ejemplo cualquiera de los 23 tARN mitocondriales conocidos. Los tARN propiamente dichos no son la plantilla si no que se utilizan como un cebador que se une al PBD en la plantilla ARN MTU (Figura 1).

35 Se pueden diseñar PBD para unirse a otros tipos de tARN tal como, tARB-Lys y tARN-Met de mitocondria de tabaco (y tARN identificados de tabaco (23) Genbank, NC 006581), mitocondria de Arabidopsis, y mitocondria de arroz (Notsu et al., Mol. Genet.Genomics 268 (4), 434-445 (2002).

40 Determinados elementos de retroelementos tales como retrovirus o retrotransposones, tienen PBDs natural que posee dominios conservados que hibridan con los dominios complementarios del tARN (usualmente tARN-met, o tARN-trp); en razón a que las estructuras conservadas de todos los tARN (las denominadas estructuras hoja de trébol), Los PBD se pueden diseñar mediante ingeniería de tal manera que lleven dominios específicos que hibridara con un tARN de elección

45 Una "secuencia de translocación de mitocondrias vegetales" (MTS) es una secuencia de ARN que es capaz de ser unida a una proteína de unión MTS vegetal y por lo tanto, El MTS y las otras secuencias de ARN que se pueden asociar con esta o fusionar con esta se pueden transportar a través de y dentro de la mitocondria. El MTS se puede seleccionar a partir de virus ARN sin envoltura, que incluyen los mitovirus de narnaviridae, tal como a partir de Cryphonectria mitovirus 1 (CMV1),

50 Ophiostoma mitovirus 3a (OMV3a), Sclerotinia homoeocarpa mitovirus, Ophiostoma mitovirus 4 (OMV4), Ophiostoma mitovirus 5 (OMV5), Ophiostoma mitovirus 6 (OMV6), virus relacionado con la debilidad Botrytis cinérea, Cryphonectria cubensis mitovirus 1a, Cryphonectria cubensis mitovirus 1b, Cryphonectria cubensis mitovirus 1c, Cryphonectria cubensis mitovirus 2a, Cryphonectria cubensis mitovirus 2b, Cryphonectria cubensis mitovirus 2c, Gremmeniella mitovirus S1 (GMVS1), Gremmeniella mitovirus S2, Helicobasidium mompa mitovirus 1-18, Ophiostoma mitovirus 1a (OMV1a), Ophiostoma mitovirus 1b (OMV1b), Ophiostoma mitovirus 2 (OMV2), Ophiostoma mitovirus 3b (OMV3b), Thielaviopsis mitovirus basicola, Cryphonectria mitovirus I, los ARN virales tales como aquellos de los virus ARN de hebras positiva tal como el virus X de papa (PVX), virus mosaico del tabaco (TMV), virus mosaico del tomate (ToMV), y ARN viral de virus ARN de hebra negativa , tal como virus del bronceado del tomate (TSWV) y virus de la mancha necrótica de Impatiens (INSV), viroides tales como virus productor de la deformación fusifoide del tubérculo de la papa (PSTVd), virus satélite tal como el virus mosaico satélite del tabaco (STMV) y similares. Otras fuentes de MTS incluyen ARN intrón grupo I y grupo II o versiones modificadas de los mismos en las que se han eliminado sitios de corte y empalme crípticos que se pueden derivar de una bacteria, un hongo o una mitocondria de un vegetal, tal como un intrón LTRB que carece de la secuencia que codificación para LTRA (proteína codificada por una secuencia de LTRA que es capaz de servir como una proteína de unión MTS en los métodos de la invención).

Preferiblemente, el intrón es un intrón del grupo II, tal como el intrón LtrB de *Lactococcus lactis* o una versión modificada de este en el que los sitios de corte y empalme crípticos se han eliminado como se destaca aquí. Los intrones grupo II se representan ampliamente en los orgánulos vegetales y hongos, y en bacterias. Los intrones grupo II útiles en el método de la invención son retroelementos altamente estructurales, móviles, que codifican proteínas multifuncionales (proteína codificada por intrón o IEP) que poseen actividad de transcriptasa inversa (RT). El IEP facilita el corte y empalme de ARN intrón mediante la estabilización de la estructura de ARN catalíticamente activa, realiza la transcripción inversa y la inserción del intrón dentro de los sitios objetivos de ADN específicos del genoma bacteriano en alta frecuencia (Moran et al. (1995) *Mol Cell Biol* 15: 2828-2838; Cousineau et al. (1998) *Cell* 94: 451-462).

Los intrones grupo II de origen bacteriano, tal como aquellos derivados de *Lactococcus* que comprenden un gen LtrA modificado, se utilizan preferiblemente en el método de la invención. La secuencia de polinucleótidos LtrA de una bacteria *Lactococcus*, tal como *Lactococcus lactis* se puede modificar para expresión óptima en vegetales al insertar en este por lo menos una secuencia de polinucleótido que comprenden uno o más intrones a partir de por lo menos una secuencia de ácido nucleico de vegetal, tal como de uno o más genes vegetales y al sustituir determinados codones seleccionados que tienen una baja frecuencia de uso en vegetales naturales con codones que ocurren con una mayor frecuencia en dichos vegetales. Normalmente, la secuencia LtrA bacteriana de interés se analiza con referencia al uso de codon de vegetales que utilizan comparaciones in silico tal como aquellos encontrados en el sitio de red www.kazusa.or.jp/codon para codones bacterianos que se presentan con baja frecuencia en vegetales. Dichos codones se pueden sustituir luego con codones que tienen una alta frecuencia de ocurrencia en vegetales, y se genera una secuencia de polinucleótidos modificados derivado in silico. A partir de esta secuencia LtrA optimizada se hace una secuencia de polinucleótidos LtrA sintética que corresponde a la secuencia generada in silico utilizando procedimientos de síntesis de polinucleótidos estándar conocidos en la técnica, y luego se pueden utilizar en la preparación de construcciones de uso en la presente invención como se destaca aquí. Se considera que al utilizar una secuencia modificada que comprende sustituciones de codones vegetales como se destaca aquí anteriormente se generan secuencias de ARN de polinucleótidos de ambiente estable de células vegetales.

Otros tipos de intrones que se pueden utilizar en el método de la invención incluyen, por ejemplo, intrón grupo I de *Tetrahymena* (GenBank Acc No.: X54512; Kruger K et al. (1982) *Cell* 31: 147-157; Roman J and Woodson SA (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2134-2139), el grupo intron III grupo II de *Scenedesmus obliquus* (GenBank Acc No.: X17375.2 nucleótidos 28831-29438; Hollander V and Kuck U (1999) *Nucl Acids Res* 27: 2339-2344; Herdenberger F et al. (1994) *Nucl Acids Res* 22: 2869-2875; Kuck U et al. (1990) *Nucl Acids Res* 18: 2691-2697), y el intrón LI.LtrB (GenBank Acc. No.: U50902 nucleótidos 2854 a 5345).

Aparte los de intrones heterólogos descritos aquí, los intrones endógenos que se presentan en la naturaleza en la mitocondria, tal como los intrones grupo II de mitocondrias vegetales, para el ejemplo el intrón 1 NAD4 de *Arabidopsis* (Unsel et al., (1997) *Nat. Genet.* 15 (1), 57-61), el intrón 1 de NAD4 de tabaco (Sugiyama et al, *Mol Gen Genómica* (2005). 272: 603-615) o de maíz Clifton et al, *Plant Physiol.* 136 (3), 3486 a 3503 (2004)), o de trigo (Ogigara et al., *Nucleic Acids Res.* 33 (19), 6235-6250 (2005)) o el intrón Cox II y el intrón 2 NADII de trigo (*Nucleic Acids Res.* 33 (19), 6235 a 6250 (2005)). Los intrones que se presentan en la naturaleza en la mitocondria de vegetales de interés se puede modificar de tal manera que tienen una homología de secuencia de aproximadamente 50%, 60%, 70%, 75 %, 80%, 85%, 90% o 95%, o de cualquier porcentaje de homología de secuencia entre ellos, y con la secuencia del intrón de partida, aunque retiene la funcionalidad, también se pueden emplear en el método de la invención. Otros MTS incluyen dominios ARN encontrados en TNT1 tabaco, Ty1 y Ty3 de levadura similar a retrotransposones u otro ARN que albergan un dominio que se reconoce mediante una proteína de unión de ARN que se controla en la mitocondria.

Una "proteína de unión de secuencia de translocación de mitocondrias" (MTS-BP) puede ser cualquier proteína de unión de ARN que reconoce y se une a los dominios ARN específicos de interés y se fusiona a un péptido de tránsito mitocondrial. Ejemplos de proteínas MTS-BP adecuadas se pueden seleccionar a partir de la proteína LtrA del grupo de proteínas de envoltura de intrón LtrB del grupo II, que se unen a virus de ARN tal como la proteína de envoltura del virus X de la papa (PVX), la proteína de envoltura de TMV, polimerasas de ARN dependientes de ARN (RdRPs) de virus ARN tal como las replicasas de PVX o TMV, proteína de transcriptasa inversa de retrotransposones, tal como Tnt1 de tabaco, Ty1-1 de levadura que reconocen estructuras en la molécula de ARN de retrotransposon, y proteínas que se unen al ARN celular, tal como proteínas de factor de elongación de traducción y proteínas de unión ribosómicas. Preferiblemente, las proteínas MTS-BP en la proteína LRTA del intrón 11LtrB del grupo II.

Un "péptido de tránsito de mitocondria vegetal" (TP) es aquel que se puede derivar u obtener a partir de una proteína dirigida a la mitocondria, por ejemplo aquellas descritas por Boutry et al. *Nature* 328340-342 (1987), el péptido señal de la unidad β F1-ATPasa de tabaco y la proteína CPN60 *Arabidopsis* y aquellas que se pueden predecir mediante programas de localización mitocondrial tal como "Predotar" y SignalP (Predotar: un servicio de predicción basado en red neuronal para identificar mitocondrias putativas y secuencias objetivo ER urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html; SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP))

La proteína "transcriptasa inversa de mitocondria", si se emplea, se puede seleccionar de una fuente de retrovirus, tal como de retrovirus vegetal tal como SIRE-1 de soya, o de una fuente de retrotransposon tal como del retrotransposón Ty1 de levadura, por ejemplo el dominio RNaseH transcriptasa (Goffeau et al., *Science* 274 (5287), 546-547 (1996)) o el retrotransposon TNT1 de tabaco (dominio RTRH) (Vernhettes et., al.; *Mol. Biol. Evol.* 15 (7), 827-836 (1998)).

Un promotor nuclear vegetal (por ejemplo, un promotor específico de núcleo exógeno) es aquel que es capaz de activar la expresión de una secuencia de ácido nucleico tal como una secuencia de cADN o una secuencia génica de longitud completa en el núcleo de una célula vegetal, que forma una secuencia de ARN transcrita. El promotor nuclear vegetal es aquel que se introduce en la parte delantera de una secuencia de ácido nucleico de interés y se asocia funcionalmente con esta. Así, un promotor nuclear vegetal es aquel que se ha colocado en la parte delantera de un componente de polinucleótidos seleccionado. Normalmente, un promotor nuclear vegetal, tal como un promotor específico de núcleo exógeno, es aquel que se transfiere a una célula anfitriona o vegetal anfitrión de una fuente diferente a la célula anfitriona o vegetal anfitrión.

El cADN que codifica un polinucleótido de la invención contiene por lo menos un tipo de promotor específico de núcleo que es operable en una célula vegetal, por ejemplo, un promotor constitutivo o inducible ligado funcionalmente a una primera y/o segunda secuencia de ácido nucleico o componente de secuencia de ácido nucleico como se define aquí y como se proporciona por la presente invención. Como se discute, esto permite el control de expresión de los polinucleótidos de la invención. La invención también proporciona vegetales transformados con secuencias de polinucleótidos o construcciones y métodos que incluyen la introducción de dichas secuencias de ácido nucleico de polinucleótidos o construcciones en una célula vegetal y/o inducción de expresión de dicha primera y/o segunda secuencia de ácido nucleico o construcción dentro de una célula vegetal, por ejemplo, mediante la aplicación de un estímulo adecuado, tal como un inductor exógeno efectivo.

El término "inducible" cuando se aplica a un promotor es bien comprendido por el experto. En esencia, la expresión bajo el control de un promotor inducible se "conmuta" o aumenta en respuesta a un estímulo aplicado (que puede ser generado dentro de una célula o proporcionado exógenamente). La naturaleza del estímulo varía entre promotores. Algunos promotores inducibles provocan pocos niveles o niveles indetectables de expresión (o sin expresión) en la ausencia del estímulo adecuado. Otros promotores inducibles provocan expresiones constitutivas detectables en ausencia del estímulo. Cualquiera que sea el nivel de expresión en ausencia de estímulo, se incrementa la expresión desde cualquier promotor inducible en la presencia del estímulo correcto. La situación preferible es cuando aumenta el nivel de expresión luego de la aplicación del estímulo pertinente mediante una cantidad efectiva para alterar una característica fenotípica. De esta manera se puede utilizar un promotor inducible (o "conmutable"), que provoca un nivel de expresión básico en ausencia del estímulo cuyo nivel es muy bajo para producir un fenotipo deseado (y de hecho puede ser cero). Luego de la aplicación del estímulo, aumenta la expresión (o se conmuta) hasta un nivel, que produce el fenotipo deseado. Un ejemplo de un promotor inducible es el interruptor génico inducible por etanol descrito en Caddick et al. (1998) *Nature Biotechnology* 16: 177-180. Se conocen en la técnica una serie de promotores inducibles.

Se pueden utilizar promotores regulados químicamente para modular la expresión de un gen o una secuencia de polinucleótidos de la invención en vegetal a través la aplicación de un regulador químico exógeno. Dependiendo del objetivo, el promotor puede ser un promotor inducible químicamente, en donde la aplicación de químicos induce la expresión génica, o un promotor que reprime químicos, en donde la aplicación de químicos reprime la expresión génica. En la técnica se conocen promotores inducibles químicamente e incluyen, pero no se limitan a, promotor In2-2 de maíz, que se activa mediante protectores herbicidas benceno sulfonamida. El promotor GST del maíz, que se activa mediante compuestos electrófilos hidrófobos que se utilizan como herbicidas preemergentes, y el promotor PR-1a de tabaco, que se activa mediante ácido salicílico. Otros promotores de interés regulados químicamente incluyen promotores sensibles a esteroides (véase, por ejemplo, el promotor inducible por glucocorticoides en Schena et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 88: 10421-10425 y McNellis et al. (1998) *Plant J.* 14 (2): 247-257) y promotores que reprimen tetraciclina e inducibles por tetraciclina (véase, por ejemplo, Gatz et al. (1991) *Mol Gen. Genet* 227: 229-237, y Patentes Estadounidenses Nos. 5,814,618 y 5,789,156), incorporadas aquí mediante referencia.

Cuando se desea la expresión mejorada en tejidos particulares, se pueden utilizar promotores específicos de tejido. Los promotores específicos de tejido incluyen aquellos descritos por Yamamoto et al. (1997) *Plant J.* 12 (2) 255-265; Kawamata et al. (1997) *Plant Cell Physiol.* 38 (7): 792-803; Hansen et al. (1997) *Mol. Gen Genet.* 254 (3): 337-343; Russell et al. (1997) *Transgenic Res.* 6 (2): 157-168; Rinehart et al. (1996) *Plant Physiol.* 112 (3): 1331-1341; Van Camp et al. (1996) *Plant Physiol.* 112 (2): 525-535; Canevascini et al. (1996) *Plant Physiol.* 112 (2): 513-524; Yamamoto et al. (1994) *Plant Cell Physiol.* 35 (5): 773-778; Lam (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 181-196; Orozco et al. (1993) *Plant Mol Biol.* 23 (6): 1129-1138; Matsuoka et al. (1993) *Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90 (20): 9586-9590; y Guevara-García et al. (1993) *Plant J.* 4 (3): 495-505.

También se pueden utilizar los denominados promotores constitutivos en los métodos de la presente invención. Los promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, el promotor CaMV 35S (Odell et al. (1985) *Nature* 313: 810-812); actina de arroz (McElroy et al. (1990) *Plant Cell* 2: 163-171); ubiquitina (Christensen et al. (1989) *Plant Mol Biol* 12: 619-632 y Christensen et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18: 675-689); pEMU (Last et al. (1991) *Theor Appl Genet* 81: 581 a 588); MAS (. Velten et al. (1984) *EMBO J.* 3: 2723-2730); Promotor ALS (Solicitud estadounidense No. de Serie 08/409,297), y similares. Otros promotores constitutivos incluyen aquellos en la Patente estadounidense No. 5,608,149; 5,608,144; 5,604,121; 5,569,597; 5,466,785; 5,399,680; 5,268,463; y 5,608,142. En un promotor nuclear vegetal preferido utilizado en el método de la invención es un promotor constitutivo.

La expresión en la mitocondria se efectúa al emplear un promotor de mitocondria vegetal, tal como elementos de regulación de transcripción y/o promotores específicos de mitocondria. Ejemplos incluyen el promotor ATP6 de tabaco o Arabidopsis mitocondria, el promotor ATP9 mitocondrias de tabaco o Arabidopsis o el promotor específico de mitocondria puede tener un "operón" policistrónico asignado a este, tal como la región Orf125-NAD3-RSP12 de tabaco (Sugiyama et al., Mol Gen Genomics (2005) 272: 603-615) o la región NAD3-RPS12-Orf299-orf156 de la mitocondria de trigo, (Clifton et al, Plant Physiol 136 (3), 3486 a 3503 (2004)

El casete transgénico de mitocondria comprende una secuencia de flanco izquierda (LFS) y una secuencia de flanco derecha (RFS) como se describe aquí, y puede incluir una región de promotor y/o una región terminadora de origen de una mitocondria vegetal mayor o menor, por ejemplo de tabaco, Arabidopsis, Brassica sp, papa, maíz (maíz), canola, arroz, trigo, cebada, Brassica sp., algodón, algas (por ejemplo, especies verde azul), lemnochora ("pirodelas"), o musgos (por ejemplo, Physcomitrella patens). Preferiblemente, las regiones mPRO y mTER se originan de especies vegetales superiores. En donde el LFS y el RFS no incluyen una región terminadora y/o promotora, estos componentes se pueden colocar adyacentes a los LFS y/o RFS, según sea adecuado o puede haber una región de separación allí entre ellas. Incluido dentro del casete de transgén de mitocondria se encuentra por lo menos un transgén o una secuencia de nucleótidos de elección que se destina para que sea transcrita y/o traducida en la mitocondria de acuerdo con el diseño del método de la presente invención, por ejemplo, para la producción de proteínas deseadas, ARN de interés, o modificación de genes mitocondriales endógenos y secuencias reguladoras. Los transgenes de interés adecuados contemplados para la producción de péptidos o proteínas en un método de la presente invención incluyen proteínas farmacéuticas y proteínas vegetales para uso en mamíferos, que incluyen hormonas, tal como insulina, preproinsulina, proinsulina, glucagón, interferones tales como interferón- α , interferón- β , interferón- γ , factores de coagulación sanguínea seleccionados del Factor VII, VIII, IX, X, XI, y XII, hormonas de la fertilidad que incluyen hormona luteinizante, factores de crecimiento de hormonas que estimulan folículos que incluyen factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de estimulación de colonias de granulocitos y similares, prolactina, oxitocina, hormona estimuladora de tiroides, hormona adrenocorticotrópica, calcitonina, hormona paratiroidea, somatostatina, eritropoyetina (EPO), enzimas tales como β -glucocerebrosidasa, hemoglobina, albúmina de suero, colágeno, proteína tóxica de insectos de *Bacillus thuringiensis*; proteína de resistencia a herbicidas (glifosato); proteínas de tolerancia a la sal; proteínas implicadas en conferir esterilidad masculina citoplásmica a líneas de reproducción vegetal; proteínas que mejoran la nutrición implicadas en la biosíntesis de fenólicos, almidones, azúcares, alcaloides, vitaminas, y vacunas comestibles, y similares. Adicionalmente, el método de la invención se puede utilizar para la producción de anticuerpos monoclonales específicos o fragmentos activos de los mismos y de enzimas industriales.

Todas las proteínas mencionadas anteriormente son del tipo humano y vegetal. Otras proteínas que se contemplan para producción en la presente invención incluyen proteínas para uso en veterinaria, y pueden corresponder a homólogos animales de proteínas humanas, tal como las proteínas humanas mencionadas anteriormente.

Los péptidos y proteínas de interés adecuados se pueden seleccionar de aquellos proporcionados aquí. Determinados homólogos de ácido nucleico de interés son útiles conferir esterilidad masculina citoplásmica a líneas de reproducción vegetal tal como la secuencia pcf de mitocondria de petunia (Nivison and Hanson, Plant Cell 1989 Nov; 1 (11): 1121-30.); el ORF79 de BORO-II RICE (Wang et al, 2006; Plant Cell 2006 Mar; 18 (3): 676-87 Epub 2006 febrero 17.), la secuencia orf107 de sorgo (Tang et al, Plant J. 1996 Jul; 10 (1): 123-33); la secuencia T-urf13 de maíz (Dewey et al, EMBO J. 1987 Jun; 6 (6): 1541-1546) y como consecuencia puede alcanzar líneas de reproducción vegetal que reproducen esterilidad masculina en menos generaciones de cruces, por ejemplo, en una generación o dos generaciones. La invención proporciona, por primera vez, uno medios confiables mediante los cuales confieren esterilidad masculina citoplásmica permanente en líneas de reproducción vegetal sin la necesidad de vincularse en múltiples cruces durante generaciones de plantas acelerando de esta manera los procesos de reproducción en donde se desea las líneas estériles masculinas, por ejemplo en especies brassica, tal como en coliflor, brócoli (por ejemplo brotes verdes y púrpuras), repollo (por ejemplo repollo rojo, verde y blancas), col rizada, brotes de Bruselas, tomate, pimientos, zapallos, canola (colza), girasol, soja, maíz (maíz), arroz, trigo, cebada y similares.

Naturalmente, el experto apreciará que cuando se presenten secuencias de ADN terminadoras nucleares en las construcciones utilizadas en la invención, se contemplan que estas comprendan una secuencia de ADN al final de una unidad de transcripción que señala la terminación de la transcripción. Estos elementos son secuencias no traducidas 3' que contienen señales de poliadenilación, que actúan para provocar la adición de secuencias de poliadenilato al extremo 3' de los transcripciones primarios. Para expresión en células vegetales la secuencia terminadora de transcripción sintasa nopalina (A. Depicker et al, 1982, J. Mol de & Applied Gen. 1:561-573) sirve como una señal de terminación de transcripción.

Aquellos expertos en la técnica serán capaces de construir vectores y protocolos de diseño para secuencias de ácidos nucleicos recombinantes o expresión génica. Dichos vectores se pueden seleccionar o construir, contienen secuencias reguladoras adecuadas, incluyen secuencias de promotores, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias mejoradoras, genes marcadores y otras secuencias según sea adecuado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook et al, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas conocidas y protocolos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciamiento, introducción de ADN en células y expresión

génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. Las divulgaciones de Sambrook et al. y Ausubel et al. se incorporan aquí mediante referencia. Los procedimientos específicos y vectores previamente utilizados con amplio éxito sobre plantas se describen por Bevan (Nucl. Acids Res.12, 8711-8721 (1984)) (Plant transformation and expression vectors. In: Plant Molecular Biology Labfax (Croy RRD ed.) Oxford, BIOS Scientific Publishers, pp 121-148).

Naturalmente, el destinatario experto apreciará que cada transgén introducido en un casete transgén estará bajo control regulador de su propio promotor mitocondrial exógeno y terminador mitocondrial. Cuando dos o más proteínas objetivo se destinan para ser producidas a partir de un único ARN portador, es preferible si son capaces de ser separadas fácilmente, por ejemplo al unirse a diferentes anticuerpos específicos de proteínas (monoclonal o policlonal) en la fase de cosecha del sistema de cultivo de célula vegetal.

Los marcadores genéticos seleccionables pueden facilitar la selección de plantas transgénicas y estas pueden consistir de genes quiméricos que confieren fenotipos seleccionables tal como resistencia a antibióticos tal como espectinomina, estreptomina, kanamicina, neomicina, higromicina, puramicina, fosfotricina, clorsulfurón, metotrexato, gentamicina, espectinomina, imidazolinonas y glifosato.

Cuando se introducen secuencias de ácido nucleico seleccionadas de acuerdo con la presente invención en una célula, se deben tener en cuenta determinadas consideraciones, bien conocidas por los expertos en la técnica. El ácido nucleico que se va a insertarse se debe ensamblar dentro de una construcción, que contiene elementos reguladores efectivos, que controlaran la transcripción. Puede estar disponible un método para transportar la construcción en la célula. Una vez la construcción está dentro de la célula, la integración en el material cromosómico endógeno ocurrirá o no ocurrirá. Finalmente, en cuanto se refiere a los vegetales el tipo de célula objetivo debe ser tal que las células se pueden regenerar en todas las plantas.

Las plantas transformadas con secuencias que contienen segmentos de ADN de interés como se proporcionan aquí se pueden producir mediante técnicas estándar, que ya son conocidas por la manipulación genética de las plantas. El ADN se puede transformar en células vegetales utilizando cualquier tecnología adecuada, tal como un vector Ti-plásmido desarmado llevado por *Agrobacterium* que explota su capacidad de transferencia génica natural (EP-A-270355, EP-A-0116718, NAR 12 (22) 8711-87215 1984), microinyección de de bombardeo de partículas (US 5100792, EP-A-444882, EP-A-434616), Microinjection(WO 92/09696, WO 94/00583, EP 331083, EP 175966, Green et al. (1987) Plant Tissue and Cell Culture , Academic Press), electroporación (EP 290395, WO 8706614) otras formas de captación de ADN directo (DE 4005152, WO 9012096, US 4684611), captación de ADN mediado por liposoma (por ejemplo, Freeman et al. Plant Cell Physiol. 29: 1353 (1984)), o el método de formación de vortices (por ejemplo, Kindle, PNAS U.S.A. 87: 1228 (1990d) phys;cal methods for the transformation of plant cells are reviewed in Oard, 1991, Biotech. Adv. 9: 1-11.

De esta manera, una vez se ha sido identificado en gen o secuencia de ácido nucleico, se puede introducir en células vegetales utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica para producir plantas transgénicas del fenotipo apropiado.

La transformación de *Agrobacterium* se utiliza ampliamente por los expertos en la técnica para transformar especies dicotiledóneas. La producción de plantas transgénicas fértiles, estables, en casi todas las plantas monocotiledóneas económicamente pertinentes es también ahora de rutina: (Toriyama, et al. (1988) Bio/Technology 6, 1072-1074; Zhang, et al. (1988) Plant Cell Rep 7, 379-384; Zhang, et al. (1988) Theor Appl Genet 76, 835-840; Shimamoto, et al. (1989) Nature 338, 274-276; Datta, et al. (1990) Bio/Technology 8, 736-740; Christou, et al. (1991) Bio/Technology 9, 957-962; Peng, et al. (1991) International Rice Research Institute, Manila, Philippines 563-574; Cao, et al. (1992.) Plant Cell Rep 11, 585-591; Li, et al. (1993) Plant Cell Rep 12, 250-255; Rathore, et al. (1993) Plant Molecular Biology 21, 871-884; Fromm, et al. (1990) Bio/Technology 8, 833-839; Gordon-Kamm, et al. (1990) Plant Cell 2, 603-618; D'Halluin, et al. (1992) Plant Cell 4, 1495-1505; Walters, et al. (1992) Plant Molecular Biology 18, 189-200; Koziel, et al. (1993) Biotechnology 11, 194-200; Vasil, I.K. (1994) Plant Molecular Biology 25, 925-937; weeks, et al. (1993) Plant Physiology 102, 1077-1084; Somers, et al. (1992) Bio/Technology 10, 1589-1594; WO92/14828). En particular, la transformación mediada por *Agrobacterium* es ahora un método de transformación alterno altamente eficiente en monocotiledóneas (Hiei et al. (1994) The Plant Journal 6, 271-282).

La generación de plantas transgénicas fértiles se ha alcanzado en cereales como arroz, maíz, trigo, avena, y cebada y (revisado en Shimamoto, K. (1994) Current Opinion in Biotechnology 5, 158-162; Vasil, et al. (1992) Bio/Technology 10, 667-674; Vain et al., 1995, Biotechnology Advances 13 (4): 653-671; Vasil, 1996, Nature Biotechnology 14 page 702). Wan and Lemaux (1994) Plant Physiol. 104: 37-48 describe técnicas para la generación de grandes números de plantas de cebada fértiles independientemente transformadas.

Se prefiere bombardeo de micro proyectiles, electroporación y captación de ADN directo cuando el *Agrobacterium* es ineficiente o inefectivo. Alternativamente, se puede emplear una combinación de diferentes técnicas para mejorar la eficiencia de los procesos de transformación, por ejemplo bombardeo con Micro partículas recubiertas con *Agrobacterium* (EP-A-486234) o bombardeo de micro proyectiles para inducir heridas seguido por cocultivo con *Agrobacterium* (EP-A- 486233).

Luego de la transformación, se puede regenerar un vegetal, por ejemplo a partir de células individuales, tejido de callo o discos de hojas, como es estándar en la técnica. Se puede regenerar completamente casi cualquier planta a partir de células, tejidos y órganos de la planta. Se revisan técnicas disponibles en Vasil et al., Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1, 11 and 111, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press, 1984, and Weiss Bach and Weiss Bach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989.

La elección particular de una tecnología de transformación se determinará mediante su eficiencia para transformar determinadas especies de plantas así como la experiencia y preferencia de la persona que practica la invención con una metodología particular de elección. Será evidente para el experto que la elección particular de un sistema de transformación para introducir ácido nucleico en células de planta no es esencial para o una limitación de la invención, ni es la elección de la técnica para la regeneración de plantas.

El término "heterólogo" se puede utilizar para indicar que el gen/secuencia de nucleótidos en cuestión se ha introducido en dichas células de la planta o un antecesor de estas, utilizando ingeniería genética, es decir, mediante intervención humana. Se puede proporcionar una célula vegetal transgénica, es decir, transgénica para la secuencia de nucleótidos en cuestión. El transgén puede ser sobre un vector extragenómico o incorporado, preferiblemente estable, en el genoma. Un gen heterólogo puede reemplazar un gen equivalente endógeno, es decir, uno que realiza normalmente la misma función o una función similar, o la secuencia insertada puede ser adicional al gen endógeno u otra secuencia. Cualquier ventaja de introducción de un gen heterólogo es la capacidad para colocar la expresión de una secuencia bajo el control de un promotor de elección, con el fin de ser capaz de influenciar la expresión de acuerdo con la preferencia. Adicionalmente, mutantes, variantes y derivados del gen tipo natural, por ejemplo con mayor actividad que el tipo silvestre, se pueden utilizar en lugar del gen endógeno. Las secuencias de nucleótidos heterólogas, o exógenas o externas, a unas células vegetales pueden ser de ocurrencia no natural en células de ese tipo, variedad o especie. Así, una secuencia de nucleótidos puede incluir una secuencia e codificación de o derivada de un tipo particular de célula vegetal o especie o variedad de vegetal, colocada dentro del contexto de una célula vegetal de un tipo diferente o especie o variedad de vegetal. Una posibilidad adicional es para una secuencia de nucleótidos que va a colocar dentro de una célula en la que esta o un homólogo se encuentra en forma natural, pero en el que la secuencia de nucleótidos se vincula y/o esta adyacente al ácido nucleico que no ocurre en forma natural dentro de la célula, o las células de ese tipo o especies o variedades de vegetales, tal como vinculadas operablemente a una o más secuencias reguladoras, tal como una secuencia promotora, para control o expresión. Una secuencia dentro de una planta u otra célula anfitriona puede ser heteróloga identificable, exógeno o externa.

También se proporcionan vegetales que incluyen células vegetales transformadas mediante un método de acuerdo con la invención, junto con cualquier parte o propágulo de la misma, semilla, progenies híbridas o autofecundadas y descendientes. Particularmente se proporcionan vegetales de cultivo transgénicos, que se han diseñado con ingeniería para llevar genes identificados como se indicó anteriormente. Ejemplos de vegetales adecuadas incluyen tabaco (*Nicotiana tabacum*) y otras especies *Nicotiana*, zanahoria, vegetales y semillas oleosas brassicas, melones, Pimientos, uvas, lechuga, fresas, remolacha azucarera, trigo, cebada, maíz (maíz), arroz, soya, arveja, sorgo, girasol, tomate, algodón, y papa. Plantas transgénicas especialmente preferidas de la invención incluyen algodón, arroz, especies de semillas oleosas Brassica tal como canola, maíz (maíz) y soya.

Además de una planta, la presente invención proporciona cualquier clon de dicha planta, semilla, progenie híbrida o autofecundada y descendientes, y cualquier parte de cualquiera de estas, tal como cortes. La invención proporciona cualquier propágulo de vegetal que sea cualquier parte que se pueda utilizar en la reproducción o propagación, sexual o asexual, que incluye corte, semillas, y así sucesivamente. También la invención abarca una planta que es una descendencia propagada sexualmente o asexualmente, clon o descendiente de dicho vegetal, o cualquier parte o propágulo de dicho vegetal, descendencia, clon o descendencia.

La presente invención también abarca el producto de expresión de polipéptido de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención como se describe aquí o se puede obtener de acuerdo con la información y sugerencias dadas aquí. También se proporcionan métodos para elaborar dicho producto de expresión mediante la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifican por lo tanto bajo condiciones adecuadas en células anfitrionas adecuadas, por ejemplo *E. coli*. Aquellos expertos en la técnica son capaces de construir vectores y diseñar protocolos y sistemas para expresión y recuperación de productos de expresión génica recombinante.

La proteína objetivo exógeno o heterólogo se contempla que es cualquier proteína de interés que se puede producir mediante el método de la invención.

Un polipéptido de acuerdo con la presente invención puede ser un alelo, variante, fragmento, derivado, mutante u homólogo del polipéptido como se mencionó aquí. El alelo, variante, fragmento, derivado, mutante u homólogo pueden tener sustancialmente la misma función del polipéptido aludido anteriormente y como se muestra aquí o puede ser un mutante funcional del mismo.

"Homología" en relación a una secuencia de aminoácidos o secuencia de polipéptido producidos mediante el método de la invención se pueden utilizar para referirse a identidad o similitud, preferiblemente identidad. Como ya se indicó

anteriormente, el alto nivel de identidad de los aminoácidos se puede limitar a regiones o dominios funcionalmente significativos.

En determinadas realizaciones, alelo, variante, derivado, derivado mutante, mutante u homólogo de la secuencia específica puede mostrar poca homología general, es decir aproximadamente 20%, o aproximadamente 25%, o aproximadamente 30%, o aproximadamente 35%, o aproximadamente 40% o aproximadamente 45%, con la secuencia específica. Sin embargo, en regiones o dominios funcionalmente significativos, la homología de aminoácidos puede ser mucho mayor. Las regiones o dominios putativos funcionalmente significativos se pueden identificar procesos de bioinformática, que incluyen comparación de las secuencias de homólogos.

Las regiones o dominios funcionalmente significativos de diferentes polipéptidos se pueden combinar para expresión de ácidos nucleicos codificantes como una proteína de fusión. Por ejemplo, las propiedades deseables o particularmente ventajosas de diferentes homólogos se pueden combinar en una proteína híbrida, de tal manera que el producto de expresión resultante, pueden incluir fragmentos de diversas proteínas parientes, si es apropiado.

La similitud de las secuencias de aminoácidos puede ser como se define y determina por el programa TBLASTN, de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10, que es de uso estándar en la técnica. En particular, se puede utilizar TBLASTN 2.0 con penalidades de espacio y Matrix BLOSUM62: existencia: 11, extensión: 1. Otro programa estándar que se puede utilizar es BestFit, que hace parte del Paquete Wisconsin, Versión 8, septiembre de 1994, (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA, Wisconsin 53711). BestFit hace una alineación óptima del mejor segmento de similitud entre dos secuencias. La alineación óptima se encuentra al insertar espacios para maximizar el número de coincidencias que utilizan el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. (1981) 2: 482-489). Otros algoritmos incluyen GAP, que utiliza el algoritmo Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas que maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de espacios. Como con cualquier algoritmo, generalmente se utilizan los parámetros predeterminados, que para GAP son una penalidad de creación de espacio = 12 y penalidad de extensión de espacio = 4. Alternativamente, se puede utilizar una penalidad de creación de espacio de 3 y una penalidad de extensión de espacio de 0.1. El algoritmo FASTA (que utiliza el método de Pearson y Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448) es una alternativa adicional.

El uso de cualquiera de los términos "homología" y "homólogo" aquí no implica ninguna relación evolutiva necesaria entre las secuencias comparadas, al conservar por ejemplo el uso estándar de términos tales como "recombinación homóloga", que solo requiere que dos secuencias de nucleótidos sean suficientemente similares para recombinación bajo las condiciones apropiadas. La discusión adicional de polipéptidos de acuerdo con la presente invención, que se pueden codificar mediante ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, se encuentra adelante.

Las enseñanzas de todas las referencias citadas aquí se incorporan en su totalidad en la presente descripción.

A continuación siguen ejemplos no limitantes y figuras que ilustran la invención.

Figura 1: Componentes principales del sistema de transformación de mitocondrias de vegetales.

(1) unidad de transformación de mitocondrias (MTU) (i) una secuencia de translocación de mitocondrias vegetales (MTS); (ii) un casete de transgén de mitocondria comprende: una secuencia de flanco izquierda (LFS)¹ y secuencia de flanco derecha (RFS)¹ para facilitar la inserción del casete en el genoma de mitocondrias utilizando recombinación homóloga, una región promotora de mitocondria de tabaco (mpro)¹, una secuencia (transgén) de interés (TG), un terminador de transcripción del genoma de mitocondria de tabaco (MTER)¹; y (iii) un dominio de unión de cebador (PBD). (2) gen H RNasa de Transcriptasa inversa traduccionalmente fusionado al péptido de tránsito de mitocondrias de la subunidad beta F1-ATPasa de tabaco (MTP). (3) el péptido de unión MTSB traduccionalmente fusionado al péptido de tránsito de mitocondria de la subunidad beta F1-ATPasa de tabaco (MTP)¹ El mpro y MTER pueden ser parte del LFS y RFS respectivamente si por ejemplo se fusiona el transgén a un gen de mitocondria natural.

Figura 2: Representación esquemática del sistema de transformación de mitocondrias

(1) Orientación de complejos de proteína de ARN a la mitocondria de las plantas.

(a) Después de transformación de la construcción de unidad de transformación de mitocondrias (MTU) en el genoma de la vegetal una expresión fuerte del ARN MTU que contiene el casete de orientación de mitocondrias y la secuencia de translocación de mitocondrias (MTS) se alcanza a partir de un promotor específico nuclear. La proteína de unión MTS (MTS-BP) se expresa a partir de un casete separado. (b) Tanto el MTS-BP y ARN MTU se transfieren del núcleo en el citoplasma en donde se traduce el MTS-BP y (c) se une al ARN MTU a través del reconocimiento del MTS para formar el complejo de nucleoproteína MTU/MTS-BP. (d) Cuando el MTS-BP lleva un péptido de tránsito de mitocondrias se transfiere preferiblemente el complejo MTU/MTS-BP en la mitocondria. Una vez se presenta el MTU en la célula de las plantas a través de transformación nuclear, la mitocondria se bombardea permanente mediante el complejo MTU/MTS-BP expresado. Dicho bombeo continuo y estable del complejo en el orgánulo orientado es un prerrequisito para alcanzar una alta eficiencia de transformación de orgánulo.

(2) transcripción inversa e inserción en el genoma de mitocondria

El tercer componente del sistema de transformación de mitocondrias es la proteína H RNasa transcriptasa inversa orientada a la mitocondria (MRT-RH). (e) el MRT-RH se expresa a partir de un casete de expresión nuclear y (f) se dirige hacia la mitocondria mediante su péptido de tránsito de mitocondria. (g) Una vez dentro del organelo, la transcripción inversa cataliza el MRT-RH del ARN MTU cebado con tARN-Met. (h) La inserción del casete de transcripción inversa dentro del genoma de mitocondrias se induce debido a recombinación homóloga entre las secuencias que flanquean el casete de transcripción de mitocondria y la secuencia homóloga en el genoma de mitocondria.

Figura 3: construcciones M21 y M28

Construcción M21

Se utiliza el vector binario pGreen0029 como una estructura y permite la selección de plantas transgénicas con kanamicina. Se utiliza para co-expresión de la unidad de transformación de mitocondrias con la proteína de unión MTS mLTRASi en la célula vegetal.

La unidad de transformación de mitocondrias de constituye de los siguientes componentes: NtmLFS1 y NtmRFS1 son homólogos a dos secuencias adyacentes en las secuencias no codificantes de mitocondrias de tabaco (posición 292641-293235 y 293262-293835, respectivamente), el gen GFP se coloca bajo el control de Arabidopsis mitocondria promotor ATP6 AtmATP6 PRO y el terminador ATP6 de tabaco NtmATP6 TER. Se diseña el PBD (dominio de unión de cebador) para capturar la mitocondria de la planta tARN-fMet para iniciar la transcripción inversa, LTRBM se basa en la secuencia intrón LtrB del Lactococcus lactis y sirve como la secuencia de translocación de mitocondrias (MTS) en él se clonan los primeros seis componentes, entre los sitios de restricción Ascl y NotI. La unidad de transformación de mitocondrias completa se coloca bajo el control del promotor 35S y el terminador nos.

El segundo casete es para expresión de la proteína de unión MTS MLTRASi colocada bajo el control del promotor AtUBI3y el terminador ags.

Construcción M28

El vector pSoup (EU048870) lleva el T-ADN del vector pGreen0179 (EU048866) que se utiliza como una estructura permite la selección de plantas transgénicas con higromicina. Se utiliza para expresión de la proteína de transcriptasa-RNasaH inversa dirigida a mitocondria (mRTRHi-Ty) bajo el control del promotor TAF2 y el terminador ags.

Figura 4: Construcción M22

Se utiliza el vector pGreen0029 binario como una estructura y permite la selección de plantas transgénicas con kanamicina. Se utiliza para coexpresión de la unidad de transformación de mitocondria con la proteína de unión MTS mLTRASi en la célula de planta.

La unidad de transformación de mitocondria se hace de los siguientes componentes: NtmLFS4 y NtmRFS4 que corresponden a la posición 24888-24579 y 24578-24269 respectivamente de las secuencias de mitocondria de Nicotiana tabacum (en la hebra complementaria). El NtmLFS4 corresponde al extremo 5' del gen que codifica para ATP6 y se puede utilizar para fusión traduccional con cualquier gen de interés, la actividad de promotor se proporciona mediante el promotor ATP6 en dirección 5' del NtmLFS4 en el genoma mitocondrial de tabaco y la terminación de transcripción se alcanza con la secuencia terminadora ATP6 dentro de NtmRFS4. Se fusionó el gen GFP al NtmLFS4 y se clona en la dirección 5' del NtmRFS4 y PBD. El LTRBM se basa en la secuencia intrón LtrB de Lactococcus lactis y sirve como la secuencia de translocación de mitocondrias (MTS) dentro del cual s clonan los primeros cuatro componentes, entre los sitios de restricción Ascl y NotI. La unidad de transformación de mitocondria completa se coloca bajo el control del promotor 35S y el terminador nos.

El segundo casete es para expresión de la proteína de unión MTS MLTRASi colocada bajo el control del promotor AtUBI3y el terminador ags.

Figura 5: Construcción M24

Se utiliza el vector binario pGreen0029 como una estructura y permite la selección de plantas transgénicas con kanamicina. Se utiliza para la coexpresión de la unidad de transformación de mitocondrias con la proteína de unión MTS mLTRASi en células vegetales.

La unidad de transformación de mitocondrias se elabora a partir de los siguientes componentes: NtmLFS3 y NtmRFS3 que corresponden a la posición de 85896-86331 y 86332-86860 respectivamente de la posición de las secuencias de mitocondria de Nicotiana tabacum. El gen PCFM se basa en el gen PCF que induce CMS de mitocondria petunia, PBD (dominio de unión de cebador) se diseña para capturar la mitocondria vegetal tARN-fMet para iniciar la transcripción

inversa. El LTRBM se basa en la secuencia intrón LtrB de *Lactococcus lactis* y sirve como las secuencias de translocación de mitocondrias (MTS) en la que se clonan los primeros cuatro componentes, entre los sitios de restricción *Ascl* y *NotI*. La unidad de transformación de mitocondrias completa se coloca bajo el control del promotor 35S y el terminador nos.

5

El segundo casete es para expresión de la proteína de unión MTS MLTRASi colocada bajo el control del promotor AtUBI3 y el terminador ags

Figura 6: Construcción M27

10

Se utiliza el vector pGreen0029 binario como una estructura y permite la selección de vegetales transgénicas con kanamicina. Se utiliza para coexpresión de la unidad de transformación de mitocondrias con la proteína de unión MTS MLTRASi en células vegetales.

15

La unidad de transformación de mitocondrias se elabora de cinco componentes: el AtmLFS5 y el AtmRFS5 son homólogos a dos secuencias adyacentes en la *Arabidopsis* mitocondrial (posición 344225-344571 y 344572-344926, respectivamente), el gen PCFM se basa en el gen PCF que induce CMS de mitocondria petunia, PBD (dominio de unión de cebador) se diseña para capturar tARN-fMet de mitocondria de planta para iniciar la transcripción inversa, el LTRBM se basa en la secuencia intrón LtrB de *Lactococcus lactis* y sirve como la secuencia de translocación de mitocondrias (MTS) en la que se clonan los primeros cuatro componentes, entre los sitios de restricción *Ascl* y *NotI*. La unidad de transformación de mitocondria completa se coloca bajo el control del promotor 35S y el terminador nos.

20

El segundo casete es para la expresión de la proteína de unión a MTS MLTRASi colocada bajo el control del promotor AtUBI3 y el terminador ags.

25

Construcción M28

Se utilizó el vector pSOUP (EU048870) que lleva T-ADN del vector pGreen0179 (EU048866) como una estructura principal y permite la selección de plantas transgénicas con Higromicina. Este se utiliza para expresión de la proteína transcriptasa-RNasaH inversa dirigida a las mitocondrias (mRTRHi-Ty) bajo el control del promotor TAF2 y el terminador ags

30

Figura 7: Fenotipo de polen abortado en plantas de tabaco transformadas con el gen *pcf* que induce CMS de mitocondria de petunia

35

(A, B) Polen de plantas de tipo silvestre (WT).

(C, D) polen de PCFM1 de línea de tabaco transgénico, transformado con el vector M24 que lleva el orf PCF que induce CMS de petunia, que muestra 90% de polen abortado.

40

Figura 8: Se realizaron modificaciones del casete de transformación de mitocondrias al diseñar el dominio de unión de cebador y posicionar los elementos fundamentales del casete de transgén.

Unidad de transformación de mitocondrias MTU; secuencia de translocación de mitocondrias MTS; dominio de unión de cebador PDB-MIT diseñado para transcripción inversa en mitocondrias utilizando tARN-Met de mitocondrias; dominio de unión de cebador PBD-CYT diseñado para transcripción inversa en el citoplasma utilizando tARN-Met citoplasmático.

45

Las modificaciones detalladas en la sección de Ejemplos 1B adelante y las figuras correspondientes incluyen modificaciones del uso de PBD para la unión de tARN-Met citoplásmico como cebador. Como una modificación, el MTS se puede ubicar en los extremos 5' y 3' del casete de transformación, tal como en el caso con el intrón LtrB. El casete de transgén se inserta dentro del intrón LtrB (dominio IV). El PDB-MIT se ubica en dirección 3' del extremo LtrB 3' de del casete (MTS-3'), de tal manera que la proteína LtrA es capaz de funcionar como una proteína de translocación y como transcriptasa inversa. La proteína LtrA tiene tres funciones principales: (1) como una maturasa (se une a ARN de LtrB y estabiliza la estructura secundaria del ARN, y ayuda en el corte y empalme); (2) como una endonucleasa (induce rupturas de ADN de cadena sencilla en el sitio objetivo); y (3) como una transcriptasa inversa (realiza la transcripción inversa del ARN de intrón después de la inserción del ARN de intrón LtrB en el sitio donante).

50

55

La proteína LtrA es incapaz de realizar la reacción de transcripción inversa de manera eficiente si el PBD-CYT se ubica adyacente a y en frente de una secuencia de translocación de mitocondrias en el extremo 3' de MTU (MTS-3') como en la figura 8(B), pero puede transcribir de forma inversa efectivamente el ARN si el PBD se ubica en dirección 3' de una secuencia de translocación de cloroplastos (MTS-3') como se muestra en la figura 8A. Dicho posicionamiento o la combinación de componentes del casete de transformación como se muestra en la figura 8(A) permite la translocación de la MTU en la mitocondria y la transcripción inversa de la MTU por la proteína LtrA. Por lo tanto, al posicionar los componentes de MTS y del PBD-MIT como se muestra en la figura 8(A) el procedimiento de transformación se simplifica ya que no hay ningún requisito para cosuministrar otro gen para proporcionar una función de transcriptasa inversa.

60

65

Se consigue una simplificación del procedimiento similar si se utiliza un PBD-CYT, ya que existe una cantidad significativa de transcriptasa inversa endógena natural en el citoplasma, y se inicia transcripción inversa mediante transcriptasa inversa endógena utilizando tARN-Met citoplásmico. Esto también elimina la necesidad del cosuministro de otro gen para transcripción inversa en las mitocondrias.

5

El caso de la figura 8A y Figura 8B se atribuye al intrón LtrB.

Figura 9: Construcciones de transformación de mitocondrias de tabaco

10 (A) Construcción M43: el PBD-MIT se fusionó al extremo 3' del intrón LtrB

(B) Construcción M44: el PBD-CYT se fusionó a MTU

15 PBD-MIT: Dominio de unión de cebador diseñado para hibridarse con el t-ARN met de las mitocondrias para iniciar la transcripción inversa. LTRB5, LTRB3: secuencias 5' y 3' del intrón LTRB, respectivamente. NtmLFS3: secuencia de flanqueo izquierda de mitocondrias de tabaco. NtmRFS3: secuencia de flanqueo izquierda de mitocondrias de tabaco. PCFM: marco de lectura abierto que induce CMS de petunia. 35S Pro: promotor del CaMV (virus mosaico de coliflor). TAF2 Pro Promotor de Arabidopsis. 1-beta MTP: péptido de tránsito de mitocondrias de subunidad beta de ATPasa 1. LTRASii: secuencia que codifica la proteína LTRA. Ags ter y nos ter: secuencias terminadoras de transcripción de agrobacterium. KanR: gen NPTII para resistencia a kanamicina.

20

Figura 10: Construcciones de transformación de mitocondrias de arroz

25 (A) Construcción M45: el PBD-MIT se fusionó al extremo 3' del intrón LtrB

(B) Construcción M46: el PBD-CYT se fusionó a MTU

30 PBD-MIT: dominio de unión de cebador diseñado para hibridarse con t-RNA Met de las mitocondrias para iniciar transcripción inversa. LTRB5, LTRB3: secuencias 5' y 3' del intrón LTRB, respectivamente. osLFS3: secuencia de flanqueo izquierda de mitocondrias de arroz. osRFS3: secuencia de flanqueo izquierda de mitocondrias de arroz. PCFM: marco de lectura abierto que induce CMS de petunia. 35S Pro: promotor del CaMV (virus mosaico de coliflor). Act1 Pro: Promotor de arroz del gen de actina. 1-beta MTP: péptido de tránsito de mitocondrias de subunidad beta de ATPasa 1. LTRASii: secuencia que codifica la proteína LTRA. Ags ter y nos ter: secuencias terminadoras de transcripción de Agrobacterium. KanR: gen NPTII de resistencia para kanamicina.

35

Sección Experimental 1A

Un método novedoso para la transformación de mitocondrias vegetales.

40 Un nuevo método para transformación del genoma mitocondrial vegetal comprende

(1) una unidad de transformación de mitocondrias vegetales (MTU) que consiste de 3 dominios principales:

45

(i) una secuencia de translocación de mitocondrias vegetales (MTS),

(ii) un casete de transgén de mitocondrias vegetales

(iii) un dominio de unión de cebador (PBD), que utiliza tARN-fMet de mitocondrias vegetales o cualesquier otros ARN mitocondriales como un cebador para transcripción inversa;

50

(2) una transcriptasa-RNasa H inversa (RT-RH) de retrotransposones, retrovirus, maturasas de intrón o cualquier proteína con actividad de transcripción inversa se fusiona a un péptido de tránsito de mitocondrias vegetales para orientarse en las mitocondrias vegetales;

55

(3) una proteína de unión de ARN que se une a la secuencia de translocación de mitocondrias vegetales (MTS), fusionada a un péptido de tránsito de mitocondrias vegetales (figura 1).

Justificación de Tecnología

60

El procedimiento de transformación de mitocondrias vegetales comprende dos etapas (véase figura 2).

(1) Orientación de un complejo de proteína de ARN a las mitocondrias vegetales.

65

La construcción de transformación de mitocondrias se expresa a partir del núcleo utilizando un promotor constitutivo. Después del suministro de construcciones de transformación de mitocondrias en la célula vegetal se logra una fuerte expresión del ARN que contiene la secuencia de translocación de mitocondrias (MTS), casete del transgén y dominio de

unión de cebador (PBD). La proteína de unión de MTS (MTS-BP) fusionada a un péptido de tránsito de mitocondrias vegetales, también se expresa en el cosuministro del mismo o de un vector de transformación nuclear diferente. Este se utiliza para unirse a MTS y facilitar la translocación del ARN de MTU en la mitocondria.

5 Una vez que el vector de transformación de mitocondrias vegetales se presenta en la célula vegetal a través de la transformación nuclear, luego las mitocondrias se bombardearán de forma permanente por el complejo de ARN de MTS-BP/MTU expresado. Dicho bombeo estable y continuo del complejo en el organelo objetivo es un requisito previo para lograr una alta eficiencia de transformación de organelo. La tecnología explota el hallazgo de que la secuencia de tránsito de mitocondrias vegetales es suficiente para permitir que el complejo de ARN MTS-BP/MTU completo sea luego
10 captado por las mitocondrias.

Las secuencias de translocación de mitocondrias vegetales (MTS) se pueden seleccionar de un número de secuencias de ARN tales como mitovirus, ARN virales (que incluyen dominios de unión a proteína de envoltura viral), grupo I y grupo II de ARN de intrón, sitios de unión de cebador de retrotransposón, o cualquier ARN que alberga un dominio reconocido por las proteínas de unión de ARN.
15

La proteína de unión a MTS puede ser cualquier proteína de unión de ARN que reconoce y se une a dominios de ARN específicos.

20 El péptido de tránsito mitocondrial vegetal se puede derivar de cualquiera de las proteínas dirigidas a mitocondrias.

La fusión de MTS-BP a un péptido de tránsito mitocondrial permite esta proteína para actuar como un portador de moléculas de ARN en las mitocondrias vegetales, siempre que estas moléculas de ARN lleven el dominio de MTS correspondiente.
25

(2) Transcripción inversa del casete del transgén e inserción en el genoma de mitocondrias vegetales.

Una vez que el ARN de MTU está dentro de las mitocondrias, su dominio de unión de cebador (PBD) captura el tARN-fMet como un cebador para formar una plantilla lista para transcripción inversa. Al mismo tiempo, una transcriptasa inversa (RT-RH) fusionada a un péptido de tránsito de mitocondrias vegetales se expresa a partir del núcleo utilizando un promotor constitutivo. Se dirige a la mitocondria donde se facilita la transcripción inversa de la MTU-ARN en ADN de cadena sencilla.
30

Esto es seguido por la inserción del casete de transcripción inversa en el genoma mitocondrial vegetal utilizando recombinación homóloga entre secuencias de flanquean el casete del transgén (LFS, RFS) y las regiones homólogas en el genoma de las mitocondrias vegetales.
35

El dominio de unión de cebador (PBD) se diseña para capturar la proteína RT-RH y el tARN-fMet de mitocondrias vegetales (o cualquier otros tARN mitocondriales vegetales) como un cebador, para iniciar la transcripción inversa del ARN de MTU, llevar el casete del transgén de mitocondrias vegetales, en el ADN de cadena sencilla.
40

Una vez que se ha transformado la población de genomas de organelos en la línea vegetal inicial, ya no se requieren transgenes codificados nucleares y luego se pueden eliminar a través de segregación en generaciones de plantas posteriores, dejando una línea vegetal de organelo transformada limpia (Figura 2).
45

Materiales y métodos.

Parte 1 - Información de secuencia de ácidos nucleicos

50 1. Preparación de una secuencia de translocación de mitocondrias vegetales con base en el intrón del grupo II (MTS).

El intrón LtrB de *Lactococcus lactis* que carece del gen que codifica LTRA (maturasa codificada por intrón) se sintetizó por un proveedor de síntesis de ADN comercial (Bio S&T Inc., Montreal (Quebec), Canadá). Los sitios de donantes y aceptores de corte y empalme potenciales se mutagenizaron para evitar el corte y empalme para la acumulación óptima del ARN de intrón del grupo II en el citoplasma vegetal, la secuencia de intrones del grupo II resultante se denominó LtrBM.
55

El dominio de inserción del casete de transgén de mitocondrias vegetales (sitios Ascl-Mlul-NotI) está subrayado y se muestra en negrita.
60

Secuencia de intrones LtrBM

GGATCCCTCGAGGTGCGCCCAGATAGGGTGTAAAGTCAAGTAGTTTAAGGTACTACTCAGTAAGATAA
 CACTGAAAACAGCCAACCTAACCGAAAAGCGAAAAGCTGATACGGGAACAGAGCACGGTTGGAAAGCGA
 TGAGTTAGCTAAAGACAATCGGCTACGACTGAGTCGCAATGTTAATCAGATATAAGCTATAAGTTGTG
 TTTACTGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTATGTGTCGATAGAGGAAAGTGTCTGAAACCTCTAGTAC
 AAAGAAAGCTAAGTTATGGTTGTGGACTTAGCTGTTATCACCACATTTGTACAATCTGTTGGAGAACC
 AATGGGAACGAAACGAAAGCGATGGCGAGAATCTGAATTTACCAAGACTTAACACTAACTGGGGATAG
 CCTAAACAAGAATGCCTAATAGAAAGGAGGAAAAAGGCTATAGCACTAGAGCTTGAAAATCTTGCAAG
 GCTACGGAGTAGTCGTAGTAGTCTGAGAAGGCTAACGGCCTTTACATGGCAAAGGGCTACAGTTATTG
 TGTAATAAAATTAATAATTGATTAGGGAGGAAAACCTCAAAATGAAACCAACAATGGCAATTTTAGAA
 AGAATCAGTAAAAATTCACAAGAAAATATAGACGAAGTTTTTACAAGACTTTATCGTTATCTTTTACG
 TCCTGATATTTATTACGTGGCGGGCGCGCCACCGTGCGGCGCTGGGAAATGGCAATGATAGCGAAA
 GAACCTAAAACCTCTGGTTCTATGCTTTCATTGTGCATCGTCACGTGATTCATAAACACAAGTGAATTTT
 TACGAACGAACAATAACAGAGCCGTATACTCCGAGAGGGGTACGTACGGTTCCCGAAGAGGGTGGTGC
 AAACCAGTCACAGTAATGTGAACAAGGCGGTACCTCCCTACTTCACCATATCATTTTTAATTCTACGA
 ATCTTTTATACTGGCAAACAATTTGACTG

SEQ ID NO.1

5 2. Casete de transgén de mitocondrias

Las posiciones de las diversas secuencias de mitocondrias se describen adelante derivadas de números de acceso de secuencia GenBank NC_006581 (mitocondria de Nicotiana tabacum) y NC_001284 (mitocondria de Arabidopsis thaliana).

10 2.1 Secuencias de flanqueo izquierda y derecha utilizadas para recombinación homóloga

El casete del transgén de mitocondrias contiene secuencias de flanqueo izquierda y derecha (LFS y RFS) para la inserción del casete completo en el genoma mitocondrial utilizando recombinación homóloga.

15 Las secuencias LFS y RFS se amplificaron a partir de secuencias codificantes y no codificantes del genoma mitocondrial de Nicotiana tabacum (NtmLFS, NtmRFS) y Arabidopsis Thaliana (AtmLFS, AtmRFS) utilizando los cebadores descritos adelante.

20 2.1.1 Los NtmLFS1 y NtmRFS1, que corresponden a secuencias no codificantes de mitocondrias de Nicotiana tabacum (posición 292641 a 293235 y 293262 a 293835, respectivamente) se amplificaron de ADN celular total de tabaco utilizando los siguientes cebadores:

NtmLFS1:

25 IM101 GCGGGCGCGCCTACTACTCTCGGTCCTTGTTT SEQ ID NO. 2

IM102 GCGGAGCTCTACCCTTTAAGACTCAATTACATCGAG SEQ ID NO: 3

30 NTmRFS1:

IM103 GCATGCATTGCATAAGTAATCTCTTTTCTTATGAG SEQ ID NO.4

35 IM104 ACTAGTAAGGGGATTTGCCACATCGTTG SEQ ID NO.5

secuencia NtmLFS1:

TATTACTCTCGGTCCCTTGTCTTGGTCTCTGTGAAAGATCCAGTCGATGGGAATGAATCCATGTTCAA
 ATCTTATTACCGGGTTCGATTACGGGAAGGAAATAGAGAAGGTAAGGGACCGCTTTCCTTGTTC AAGC
 CGGTATTGTTT GAGTAAGTAGTAAGTAAGTGAGAAGTGGTGAATTGGCCAGGAGGAATAAAGCTTATT
 TCAAGTACTAATAAAAAGCATT CATTACAAACTCTTGTGCTCACTTATCCCAAGTATAGGATGTTTTCC
 CTGAGCCTGTCTGTGTTGAATACGCTTTTTCCGTGTAGAATAGAGATTCTCTCTAAGGTTGATAGAAT
 ATACGTTTTCTTTCTCTGATTAAAGGTTGTCCAAAGAGGACTAAGAGACAGATGCTGTGCTTGCAAGT
 AAGCTTCAGCCAAGCATCAGATAAACCAAGTTCGGGTTGGGAAAAGGGCTATTTACCCAGCAATATA
 GAATAATTATTACCCCCAGCACATCCCAAATGAGAGCATCGTCTTTACCCCTAGAAAAGGTGCGATG
 TAATTTCTGGTTCGATTACATTGCTCGATGTAATTGAGTCTTAAAGGGTAGAGCTC

SEQ ID NO.6

Secuencia NtmRFS1:

ATTGCATAAGTAATCTCCTTTCTTATGAGAACTACGAATCATCCTCATGAATAAGCTCTACTCTACCT
 TAAGGAGATGTGGAGGCAATAGGTCCCGTGCAGCTTTAACTAACTCTACTCCTCCATACGCCTATCCT
 TTAGTTTAGTGGGCCAGGTCCTCCAGCCTTCCATTAGCTTTTCGATTTAGTTTGCATTCAAAGTCTTGG
 AATGCGAGCTTATGTGCTTTCAGGTATAGGCACCATTGCGCTGACTTTCTTGAAGTCCTAGGATTCTC
 CCCTAGTATTCCATTCTCTCCCCCTCTCGGCCTTGCTTTTCATTCCTGTCTCATTGAAATTGCTCCTA
 AGGCAGGGAGTCTTCTCGAAGCTGTCTAAGTCTTGTAAGGCTCCTATATCTATATATAGAGAGGTCAT
 GGTATGGAGGGAGGATTTCTACGCGCAACATCGTGGTTGGGGCATTCCCTCCTTCTTTTAAAAGAAGAC
 TAGAGGACGAAAGAAGAAGCTTTACATCGGATAAAGCCTAATCCACTGTCCCTTGAAGATTGGAAG
 ATAGTGAAGGCCGACTTCCTTTTTAAAGATCACTCAACGATGTGGCAAATCCCTTACTAGT

SEQ ID NO.7

5

2.1.2 Los NtmLFS3 y NtmRFS3, que corresponden a las secuencias de mitocondrias de *Nicotiana tabacum* (posición 85896-86331 y 86332-86860, respectivamente) se amplificaron a partir de ADN celular total de tabaco utilizando los siguientes cebadores:

10

NtmLFS3

IM263 GGCGGCCAGCAGATTTCTCCCTCTATC

SEQ ID NO.8

15

IM264 GCATGCAGATCGACGACGGAACGAAGAAC

SEQ ID NO.9

NtmRFS3

IM265 TCTAGATCCAATTTCTCCGGTATGC

SEQ ID NO.10

20

IM375 CCGCGGTACGGTCCGTGCGCCGT

SEQ ID NO.11

Secuencia NtmLFS3:

AGCAGATTTCCCTCCCTCTATCAACTCCTTTTTTATGGTCGGGAGGATCCACAATTCTTCATTGATCCA
 CAAGACCTGGATTCCATACTGAGGGTGCACCTTGAACCCTTAGAATTCAATCACCTGCTCTATGCCA
 GGTCTTAGAAAGTCTATGTGTGCGAGAAGCATGATTCCCCTTTTTATCAAGATGTAAAAATGGCTCAAG
 CGCATCATTTTCGTGGCTTTATAAACTTAAAGCACCAAGCGAAAATTGGAAATGCAACATCGCCTAGAG
 TTAGGAGAGGTATGGAAATCTCTTGAGAGAAGGAACGCTTTTCTAAGCCAGGAAAACGCCTCTCTAAG
 AGAAAACTTTTAATTCTCGACAGGGAAGCCCCATAGAAATTCTTCTTTGTTGTGTTGCTATCCTAAA
 ATTGCGTTCTTCGTTCCGTCGTCGATCT

SEQ ID NO.12

Secuencia NtmRFS3:

TCTAGATCCAATTTCTTCCGGTATGCCGCTCCGCCAGCAAGGAGCGAAAGAACCAAGTTTTCTGTGGT
 GATGTCAGAAATTTGCACCTATTTGTATCTATTTAGTGATCAGTCCGCTAGTTTCTTTGCTCCCACTCG
 GTCTTCCTTTTCTATTTTCTTCCAATCTTCGACCTATCCAGAAAAATTGTCGGCCTACGAATGTGGT
 TTCGATCCTTCCGGTATGCCAGAAGTCGTTTTGATATAAGATTTTATCTTGTTCCATTTTATTTAT
 TATTCTGATCCGGAAGTAACCTTTTCTTTCTTGGGCAGTACCTCCCAACAAGATTGATCCGTTTG
 GATCTTGTCATGATGGCCTTTTTATTGATTTTGACGATTGGATCTCTCTATGAATGGAAAAGGGGT
 GCTTCGGATCGGGAGTAACCACTAGTGAGAGGGCAAAAATTGGGGGAAGGACAAAGGAAAGAGCGAT
 GCCTACATTAATCAATTGATTCGTCATGGTAGAGAAGAAAAACGGCGCACGGACCGTA

SEQ ID NO.13

2.1.3 Los NtmLFS4 y NtmRFS4 que corresponden a la posición 24888-24579 y 24578-24269 de las secuencias de mitocondrias de *Nicotiana tabacum*, respectivamente (en la cadena complementaria).

10 El NtmLFS4 corresponde al extremo 5' del gen que codifica la ATP6 y se puede utilizar para fusión traduccional con cualquier gen de interés, se proporciona la actividad del promotor por el promotor ATP6 en dirección 5' de NtmLFS4 sobre el genoma mitocondrial del tabaco y se realiza la terminación de la transcripción con la secuencia terminadora ATP6 dentro de NtmRFS4. Cualquier secuencia de codificación mitocondrial vegetal se puede utilizar en lugar de ATP6 para conseguir la expresión de cualquier gen de interés.

15 Los NtmLFS4 y NtmRFS4 se amplificaron del ADN celular total del tabaco utilizando los siguientes cebadores:

NtmLFS4

20 IM376 GGCGGCCAGGGTATGATACCTTATAGCT SEQ ID NO.14

IM287 CTCGAGTGAGACTCGCTTTTGTTT SEQ ID NO.15

NtmRFS4

25 IM289 GAGCTCATGGGTATACTTAGTCGTGG SEQ ID NO.16

IM377 CCGCGGCTGAGATAGCTCCGTAACTAAT SEQ ID NO.17

30 Secuencia NtmLFS4:

CCAGGGTATGATACCTTATAGCTTCACAGTTACAAGTCATTTTCTCATTACTTTGGGTCTCTCATT
 CTATTTTTATTGGCATTACTATAGTGGGATTTCAAAAAAATGGGCTTCATTTTTTAAGCTTCTTATTA
 CCTGCAGGAGTCCCCTGCCATTAGCACCTTTTTTAGTACTCCTTGAGCTAATCCCTTATTGTTTTCG
 AGCATTAAAGCTCAGGAATACGTTTATTTGCTAATATGATGGCCGGTCATAGTTCAGTAAAGATTTAA
 GTGGGTTCGCTTGGACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTATATTCATAGGGGATCTTGGTCCTTTA
 TTTATAGTTCCTTGCAATTAACCGGTCTGGAATTAGGTGTAGCTATATCACAAGCTCATGTTTCTACGAT
 CTTAATCTGTATTTACTTGAATGATGCTATAAATCTTCATCAAAGTGCTTCTTTTTTTATAATTGAAC
 AAAAGCGAGTCTCA

SEQ ID NO.18

Secuencia NtmRFS4

ATGGGTATACTTAGTCGTGGAGCATTCCGAGTATTTGCTTTAGGGATCGTTCCTGCGCATCTCCTTAC
 TTTATAGCAGTTATTGCTCCGGTCCAGAAGGTATAGCTCTCGCCTCAGCTTTTTCTTTGAAATCGGA
 GACTGTTCCAATTTCTACTGAGATAGGCAAGCGGAGGGAGAAGTACTAGACGTATCTTGCTAGGCAAAGA
 CAGGTTAGAATGGATAGCTCGCGGGTGGGATTGACGGGATAGATCACTATTGCAGAAGGAGGTAGAAC
 CGGGGAAGAATTATGGCTATAAAGGTCCTCGCCCTCTTAGGCACATGGTTCTAAAGATTAAATCTCA
 AAGCGGTACTAAAGATTAGGCAGAAGAAGAACTAGAATCTTCGCCCTCCCTTGTACCAA
 GAAGCAAGTTCAGAACATAAGGATAATGGGCTCGTCTATTATAAGTTATTAGTTTACGGAGCTATCTC
 AG

SEQ ID NO.19

2.1.4 Los AtmLFS5 y AtmRFS5 que corresponden a secuencias de mitocondrias de Arabidopsis thaliana (posición 344225 a 344571 y 34472 a 344926, respectivamente) se amplificaron a partir de ADN celular total de Arabidopsis utilizando los siguientes cebadores:

AtmLFS5

IM398 GCGCGCCGGGAGGAAGCTGGGCCAGTAGT SEQ ID NO.20

IM399 GCATGCGAAAAATAAAGAAAGAAGCAAAGCCCAT SEQ ID NO. 21

AtmRFS5

IM400 ATCGATATGCCGCTTCTTCGCCA SEQ ID NO.22

IM401 CCGCGGATTTGTGCCCTATCACTTTAC SEQ ID NO. 23

Secuencia AtmLFS5

GGGAGGAAGCTGGGCCAGTAGTCCCCTATCCATACAGGAGGGATGAAATGATTGGGGGGGATAGCGTA
 GAGGCGATAGAACGCCCTTCTGGCGAAATACCCCGAAGGCTCTCCCTCTGCGGAGATCATAGAGAT
 GGCCGAATAGAGGCCGAAGATCTATTTCGAGATCAAAGCCCAAATCATCCAACGGATGGCTCTATATG
 ACCCAACCGCGATTGGATGGCGCGTGGGGCTCGGGCCCTCGATAATCCGAGGACCACTAGTGGGGAA
 GAGTCCTTGGAGCGTCTTTATGATATATGGAAGGACCTCCAAGAAACCGGGCCCTCTCGGACGAGTT
 TTCTCGTTTACAAGAGAAAAGTATTCCTCAAGAAAGCGGCCCTGGGGGGGACCCTATCGCATAAGGTC
 TGCAAGCCTTTCGGGATGGGCTTTTGCTTCTTTCTTTATTTTTTCG

SEQ ID NO.24

Secuencia AtmRFS5

ATATGCCGCTTCTTCGCCAGCAAGGAGCGAGAAAAACAAAGTGGGCTGTAATGATGTCAGAATTTGCAC
 CAATTTCTATCTATTTAGTGATTAGTCTGCTAGTTTCTTTGATCCTACTCGGTGTTCCTTTTCCATTT
 GCTTCCAATAGTTCTACCTACCCAGAAAAATTGTCGGCCTACGAATGTGGTTTCGATCCTTCCGGTGA
 TGCCAGAAGTCGTTTCGATATACGATTTTATCTTGTTCATTTTATTTTTAATCCCTGATCTGGAAG
 TAACCTTTTTCTTTCCCTGGGCAGTACCTCCCAACAAGATTGATCTGTTTGGATTTTGGTCCATGATG
 GCCTTTTTATTTATTTTACGATTGGATTTCTATATGAATGGAAAAGGGGTGCTTCGGATCGGGAGTA
 AAGTGATAGGGCACAAAAT

SEQ ID NO.25

2.2 Secuencias promotora y terminadora del promotor de mitocondria vegetal

5 2.2.1 Las secuencias promotoras ATP6 se amplificaron a partir de ADN celular total de Nicotiana tabacum (NtATP6-PRO) y Arabidopsis thaliana (AtATP6-PRO) utilizando los siguientes cebadores:

NtATP6-PRO

10 IM364 GGCGCGCCTCTAGTCGAATAGAGTATTAG SEQ ID NO.26

IM365 ATCTCGAGTGTGATTGAGATAAAAAGATTCC SEQ ID NO.27

AtATP6-PRO

15 IM346 CTGCATGCTCCTCTACTGAGTCAGTGACAG SEQ ID NO.28

IM347 ATTCTAGAATTGGATTAATTGATTTCAACAAAATG SEQ ID NO.29

20 Secuencia NtATP6-PRO

CCTCTAGTCGAATAGAGTATTAGTCCGCTCCATTATATTCCCCATTATTTCACTTTCTCGCTATTCGA
 AATATCATAAGAGAAGAAAGCTGGCAGGTTGGATCCTAGGGTAGATTCTGCTGTTGAATGATCGACT
 AGCTTCCTCTTTAGTTCTTTGATATTGGGTTCGTGTTCAAGTACCGCTCTTTTTATATATGAAATTA
 CTTCGTCCTTTTTTTAGCCCTTTTTCGTTTGTCATCTTTTTTCTCCCATGCTTCCGTTGGTCAA
 CAACCAACCAAAGTGCTCTATACTTCTTCACTACTCGTACAGGCTTGACGGAGTTAAGCTGTATTGAG
 GGAATCTTTTTATCTCAATCA

SEQ ID NO.30

Secuencia AtATP6-PRO

25 TCCTCTACTGAGTCAGTGACAGAAGTGCAGCAGCCAATAATACGTATATAAGAAGAGGACTGCTTACG
 GGATCAAACATCAATCTCATAAGAGAAGAAATCTCTATGCCCCCTTTTTCTTGGTTTTCTCCCATGC
 TTTTGTGGTCAACAACCAACCACAACCTTTCTATAGTTCTTCACTACTCCTAGAGGCTTGACGGAGTG
 AAGCTGTCTGGAGGGAATCATTTTGTGAAATCAATTAATCCAAT

SEQ ID NO.31

2.2.2 La secuencia terminadora de ATP6 se amplificó a partir del ADN celular total de Nicotiana tabacum (NtATP6-TER) utilizando los siguientes cebadores:

30 IM289 GAGCTCATGGGTATACTTAGTCGTGG SEQ ID NO.32

IM366 CCGCGGCGAGGACCTTTATAGCCATAATTC SEQ ID NO.33

Secuencia NtATP6-TER

ATGGGTATACTTAGTCGTGGAGCATTCCGAGTATTTGCTTTAGGGATCGTTCCTGCGCATCTCCTTAC
TTTATAGCAGTTATTGCTCCGGTTCAGAAAGGTATAGCTCTCGCCTCAGCTTTTTCTTTGAAATCGGA
GACTGTTCCAATTTCTACTGAGATAGGCAAGCGGAGGAGAAGTACGTATCTTGCTAGGCAAAGA
CAGGTTAGAAATGGATAGCTCGCGGGTGGGATTGACGGGATAGATCACTATTGCAGAAGGAGGTAGAAC
CGGGGAAGAATTATGGCTATAAAGGTCCTCG

SEQ ID NO.34

5

2.3 Secuencias de transgén

2.3.1 Secuencia de proteína fluorescente verde (GFP)

10 El gen GFP se sintetizó de acuerdo con el número de acceso GenBank XXU70496

Secuencia GFP

ATGAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGAATGTTAA
TGGGCACAAATTTCTGTGAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAAGTACCCCTAAAT
TTATTTGCACTACTGGAAAAGTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTACTTTCACTTATGGTGT
CAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGG
ATACGTGCAGGAGAGGACCATCTCTTTCAAGGACGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGT
TTGAGGGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATC
CTCGGCCACAAGTTGGAATACAAGTACAAGTACAAGTACAAGTACAAGTACAAGTACAAGTACAAGTACA
TGAATCAAAGCTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATT
ATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAA
TCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGC
TGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAA

SEQ ID NO.35

15

2.3.2 Gen para inducción de esterilidad masculina citoplasmática

20 La secuencia que codifica para el gen PCFM se basó en el gen PCF de mitocondrias de petunia responsable de la inducción de CMS. Comprende un promotor, marco de lectura abierto y secuencia no traducida 3'. Se modificó para eliminar los sitios de corte y empalme putativo para expresión óptima del ARN de PCFM en el citoplasma en tránsito a la mitocondria.

El PCFM se sintetizó utilizando un proveedor de síntesis de ADN comercial (Bio S&T Inc., Montreal (Quebec), Canadá).

25 La ubicación de los sitios donantes mutagenizados están subrayados

Secuencia PCFM

GAACTCAATGGGGCCAGTTATAGCATCCTGCTTCTTCTTACAAAAGAAATTCATAAGATAAGAGAGA
 TGAGGCAAAGAAGGAATTGATAGAGGTGCGGCGAGAAGTTCAATACCTTCTTGATCGAGAAAATGTCC
 TTGCTTGTACTTCTCTTTCTTTATCGAGATTGGGTTGGTGTTCAAGTGTACCGCTTGTCTAGCCTATGC
 TTTGCATGAACATCTCAATGTCCAAGATAAAAAGAACGAGGGGAAGAATCGACGAGGCCAGTGTCTC
 GAAGAGAAAATCGTGATGGAAAAAGCGTGAGGAGAATTCGAACTCGAGATGTTAGAAGGTGCAAAAT
 CAATGGGTGCAGGAGCTGCTACAATTGCTTCAGCGGGAGCTGCTATCGGTATTGGAAACGTCCCTAGT
 TCCTCGATTCAATCCGTTTTAGGGATACAAATAACAGACTTACATCACGATGTCTTTTTCTTCGTTAT
 TCTGATTTTGGTTTTTCGTATCATGGATCTTGGGTGCGGCTTTATGGCATTTCCTACTATAAAAAAATC

 CAATCCCGCAAAGGATTGTTTCATGGAACACTACTATCGAGATTCTTCGGACCTTATTTCTTAGTATCATC
 CCTATGTTTATTGCTATAACCATCATTGCCCCTGTATGGGTATTCGGACTATAACAGTTCGGATGAACA
 GTCACTCACTTTTGCAGTTATACGATTCCAGAAGATGATCCAGAATTGGGTCAATCACGTTTTATTAG
 AAGTCGACAATAGAGTGGTGTACCAGCAAACAGTTCTCTCCGTTTTATTGTAACATCTGCGGCTGTA
 CCTTCTTAGGTGTCAAAGGTGATGCTGTGCCCTCCTTAGGTGTCAAAGGTGATGCTGTGCCTTCCTT
 AGGTGTCAAAGGTGATGCTGTGCCCTGGGCTGGGCGGGTTTTTCAGACTTGGACCCGAGCTTTTGAGC
 GTTTTGGGCTGTTGACGGTTGCCCATTCGCGCCGGCACCAGAACATCAAGCTCGGGCTCGGTAGTCAGT
 CTTCCACAGGACGAAATATGGGCCGCCCTTGAGGGCGATCCCCAGGCCCTTCGGGAAGACGGGCAATT
 TCACGCCGTGCGCCCTGAGGGGAATCCCCAGGCCCTTCGGGAAGACGGGCAATTTACGCCGTGCGCC
 CTGAGGGGAATCCCCAGGCCCTTCGGGAAGACGGGCAATTTACGCCGTGCGCCCTGAGGGGAATCCC
 CAGGCCCTTCGGGAAGACGGGCAATTTACGCCATCGCCTTTGACCCTCTTATAGCAACACGGCAAGA
 CGCGTGGAATACGCTACTTGTCTTGTGCGGCGCAGCACCAAAATTGAGCCTAAGGCCAATTTTGTTA
 CTAAAGCAGGGGAAGATCTTGGTATAGATACCGCAGACCCTGTTGCGCTTGACAAGTTAGTACGGGTA
 CTGAACACGTATATCCAACCTCGCCCCATTAGAAAGCGGGAGAAAGGTCTCCAAAACCTGAAAGCCAC
 GATGGCTGAATGGGAAAAGAACGGAAGGCCCTAAGTGGTGTGCTGACTTTTTTTCAATTATAATTA
 TAAAAGGAGTTACCGAATTTACGCGGTGGCCCTTTTATGTATGTTGCTGTGCTAAAGTTTCGTTCT

SEQ ID NO.36

- 5 2.4 Dominio de unión de cebador para transcripción inversa
 - Se diseñó un dominio de unión de cebador (PBD) para capturar tARN-fMet de mitocondrias vegetales como se describe por Friant et al., (1998) que se va a utilizar como una plantilla para transcripción inversa
- 10 El PBD se construyó al sobreponer PCR utilizando el siguiente grupo de cebadores:

IM374	TTCCGCGGCCTATCTCACATTCACCCAATTGTCA	SEQ ID NO.37
IM368	TTAGAAGTATCCAATGCACAGTAGGTACCATGACAATTGGGTGAA	SEQ ID NO.38
15 IM369	ATTGGATACTTCTAAGGAAGTCCACACAAATCAAGAACCATTAGA	SEQ ID NO-39
IM370	CTCACATTCTTCTGTTTGGTTAGATGAAACGTCTAATGGTTCTTGA	SEQ ID NO.40
- 20 PBD MIT

TATCTCACATTACCCAATTGTCATGGTACCTACTGTGCATTGGATACTTCTAAGGAAGTCCACACAA
 ATCAAGAACCATTAGACGTTTCATCTAACCAAACAGAAGAATGTGAGAAGGCTTCCACTAAGGCTAAC
 TCTCAACAGACAAC

SEQ ID NO. 41

5 3 Péptido de tránsito de mitocondrias (mTP)

La secuencia que codifica el péptido de tránsito de subunidad de ATPasa 1 β mitocondrial (1 β -mTP) se amplificó a partir del ADN celular total de tabaco con los siguientes cebadores:

10 Las proteínas fusionadas traduccionalmente a 1 β -mTP se pueden accionar dentro de las mitocondrias vegetales.

IM267 AACTCGAGTCTCTCTACTCCTTTAC SEQ ID NO.42

IM268 ATAGCATGCTGATGGCTGAGATGCCGGTG SEQ ID NO.43

15 Secuencia 1 β -mTP

TCTCTCTACTCCTTTCACTCTCTCTAGCCAAACCCTCCACCATGGCTTCTCGGAGGCTTCTCGC
 CTCTCTCCTCCGTCAATCGGCTCAACGTGGCGGCGGTCTAATTTCCCGATCGTTAGGAACTCCATCC
 CTAAATCCGCTTACGCGCCTTTACGCGCATCCCCTAAGGGATTCTCTTAAACCGCGCCGTACAG
 TACGCTACCTCCGCAGCGGCACCGGCATCTCAGCCATCA

SEQ ID NO.44

20 Proteína de transcriptasa RNasa H inversa dirigida a mitocondrias

El gen de transcriptasa RNasa H inversa del retrotransposón de Ty1-H3 de levadura (Boeke et al., Mol Cellul Biology (1988), 8: 1432-1442; No. de acceso de banco M18706) se optimizó para uso de codones en plantas y mediante inserción de 5 intrones del genoma de Arabidopsis (intrón 1 de At1g04820, el intrón 2 de At2g29550, intrón 3 de At1g31810, intrón 4 y 5 de At1g09170). El gen se sintetizó por un proveedor de síntesis de ADN comercial y se fusionó a la secuencia que codifica el péptido de tránsito de mitocondrias 1 β -mTP. El gen resultante se denominó mRTRHi-Ty1. Los intrones están subrayados y aparecen en negrita. La secuencia que codifica 1 β -MTP está en minúscula cursiva.

30 Secuencia mRTRHi-Ty1

ctcgagtctctctctactcctttcactctctctctagccaaaccctccaccatggcttctcggaggct
tctcgcctctctcctccgtcaatcggctcaacgtggcggcgggtctaatttcccgatcgttaggaaact
ccatccctaaatccgcttcacgcgctcttcacgcgcatcccctaagggattcctcttaaaccgcgcc

gtacagtagctacctccgcagcggcaccggcatctcagccatcagcatgcATGAACAATTCATCCCA
 CAACATCGTTCTTATCAAGACTCCAACACTGTTTCTGAGCAGAACACTGAAGAATCTATCATCGCTG
 ATCTTCCACTTCTGATCTTCTCCAGAATCTCCTACTGAATTTCTGATCCATTCAAAGAACTTCCA
 CCTATCAACTCAAGACAACTAACTCTTCATTGGGCGGAATTGGCGATTCTAATGCTTACACTACTAT
 CAACTCTAAGAAGAGGTATTGTAGCCAGCCTCAACCAGTCTTTTTGCTGTTACATTTCTTGGGCTCA
TCTAATGTTATTTTCTTATTTGTTTCAGGTCACTTGAAGATAATGAACTGAAATCAAAGTTTCTA
 GGGATACATGGAATACTAAGAATATGAGATCACTTGAACCTCCAAGATCTAAGAAGAGAATCCATCTT
 ATTGCAGCTGTTAAAGCTGTGAAATCAATCAAACCAATTAGAACAACCTTAGATACGATGAAGCAAT
 TACATACAACAAAGACATCAAGGAGAAGGAGAAATACATCGAGGCTTACCACAAAGAAGTTAACCAAC
 TTCTTAAGATGAAAACCTGGGATACTGATGAATACTACGATAGAAAAGAGATTGACCCTAAGAGAGTT
 ATCAACTCAATGTTTCATCTTCAACAAGAAGAGAGACGGAACCTACAAAGCTAGATTTCGTTGCAAGAGG
 AGATATTCAGCATCCTGACACTTACGATTCAGGTAAGTATTCCAATGTTCTTCGATTATGAGTCAATG
TTGTTACTGTATCTGTCTCTGTGGTTTATTGTTTCAGGCTTAGTTATTGATTAGTATTGAACTTCAC
TCACATATTTTTTGTGTTGTTTCTGAATTGTGCAGGTATGCAATCTAATACTGTTTCATCACTACGCA
 TTGATGACATCTCTTCACTTGCATTGGACAATAACTACTACATTACACAACCTGACATATCTTCTGC
 ATACCTTTACGCTGATATCAAGGAGGAGCTTTACATTAGACCTCCACCACATTTGGGAATGAATGATA
 AGTTGATCCGTTTGAAGAAATCACTTTACGGATTGAAACAATCTGGAGCTAATTGGTACGAACTATC
 AAATCATACTTATTACAGCAATGCGGTATGGAGGAAGTTAGGGGATGGTCATGCGTATTCAAGAACCTC
 TCAAGTTACAATCTGCCTCTTCGTTGATGATATGGTGCTCTTCTCTAAGAATCTTAACTCAAACAAGA
 GAATCATTGAGAAGTTGAAGATGCAATACGACACTAAGATCATCAACCTTGGAGAATCTGATGAGGAA
 ATTCATACGACATTCTTGGATTGGAAATCAAATACCAAAGAGGTGAGTTATATTTAACAGCTCATCA
GTTACTTAAACACTTTTTGGGACAAGCAGTTCAAACCTCATGTTCCAATCCTAAAATTAATTGCAATTC
ACAGGTAAGTACATGAAGTTGGGAATGGAAAACCTATTGACTGAGAAGATTCTTAACTTAACTGTTCC
 TTTGAATCCAAAGGGAAGAAAGCTCTCTGCTCCAGGACAACCAGGACTTTACATTGACCAGGATGAAC
 TTGAGATTGATGAGGATGAATACAAGGAGAAAGTACACGAGATGCAGAAGTTGATTGGACTTGCTTCA
 TACGTTGGATACAAATTCAGATTCGACCTTCTTACTACATCAACACACTTGCTCAGCATATACTTTT
 CCCATCTAGGCAAGTTCTTGACATGACATACGAGCTTATCCAATTCATGTGGGACACTAGAGACAAGC
 AACTCATATGGCACAAGAACAAGCCTACAGAGCCAGATAACAAGCTCGTTGCAATCTCTGATGCTTCT
 TACGGAAACCAACCATACTACAAATCACAATTTGGAACATCTACTTGCTTAAACGGAAAGGTACTTTT
CTCAAAGACTTTACCTTATTGTGGAATATTGAATTTTCTGAAAGACTTCACCTTATCTACATTTGTA
TTTTACTATGGTAATCAGGTGATTGGAGGAAAGAGCACTAAGGCTTCACTTACATGCACTTCAACTAC
 TGAGGCAGAGATCCACGCTATATCAGAATCTGTACCCTTCTTAACAACCTTTCTTACCTTATCCAAG
 AGCTTAAACAAGAAGCCAATCATCAAGGGACTTCTTACTGACTCAAGATCAACAATCTCTATCATTAAAG
 TCTACAAATGAAGAGAAATTCAGAAACAGATTCTTCGGAACAAAGGCAATGAGACTTAGAGATGAAGT
 TTCAGGTAAGTATTAACCTTACCAAATGATCAATATTATTTTGAATGCAGGTTTTAGAATAATACTCT
CTGCCGTTCTTGTGTTATTTCCAGGTAACAACCTTTACGTTTACTACATCGAGACTAAGAAGAACATTG
 CTGACGTTATGACAAAGCCTCTTCTATCAAGACCTTCAAGTTGCTTACTAACAAATGGATTCAATTA
 AATGGATTCATTAA

SEQ ID NO. 45

5

5 Proteína de unión MTS (MTS-BP)

La proteína LtrA de *Lactococcus lactis* codificada por el LtrB intrón es capaz de unirse a la secuencia de translocación de mitocondrias vegetales (MTS) con base en intrón LtrB descrita en la parte 1 y por lo tanto sirve como una proteína de

unión de MTS. La secuencia de la proteína LtrA se optimizó primero para uso de codones en plantas y 5 intrones vegetales se insertaron en la secuencia de codificación para mejorar la expresión LtrA en plantas. Los intrones 1, 2 4 son del gen de Arabidopsis At5g01290, los intrones 3 y 5 se seleccionaron de genes de Arabidopsis At5g43940. El gen se sintetizó por el proveedor de síntesis de ADN comercial y se fusionó a la secuencia que codifica el péptido de tránsito de mitocondrias 1 β -mTP. El gen resultante se denominó mLTRASi. La proteína mLTRASi es capaz de unirse a las moléculas de ARN que llevan la MTS de intrón LtrB y transferir estos ARN en las mitocondrias vegetales.

Los intrones vegetales insertados en la secuencia de codificación del gen LtrA están subrayados y se muestran en negrita. La secuencia que codifica 1 β -MTP está en minúscula y cursiva.

Secuencia mLTRASi:

*ctc***gagtctctctctactcctttcactctctctctagccaaaccctccaccatggcttctcggaggct**
tctcgcctctctcctccgtcaatcggctcaacgtggcggcggtctaatttcccgatcgttaggaaact
ccatccctaaatccgcttcacgcgcctcttcacgcgatcccctaagggattcctcttaaaccgcgcc
*gtacagta***cgctacctccgcagcggcaccggcatctcagccatcagcatgc**ATGAAGCCAACAATGGC
AATCCTCGAACGAATCTCTAAGAACTCACAGGAGAACATCGACGAG**GTACAATAACCCATATATATGA**
ATTGATTCATGTGTTACTCGTACTTGTGTTGAAATATGTTTGGAGCAAGTTTGATACTTTTGGATGATGA
TATCGCAAATTCGTTATCTTTTTGGCGTTATAGGTCTTCACAAGACTTTACCGTTACCTTCTCCGTCC
 TGACATCTACTACGTGGCATATCAGAACCTCTACTCTAACAAGGGAGCTTCTACAAAGGGAATCCTCG
 ATGATACAGCTGATGGATTCTCTGAGGAGAAGATCAAGAAGATCATCCAATCTTTGAAGGACGGAACT
 TACTACCCTCAGCCTGTCCGAAGAATGTACATCGCAAAGAAGAAGACTCTAAGAAGATGAGACCTCTTGG
 AATCCCAACTTTCACAGACAAGTTGATCCAGGAGGCTGTGAGAATCATCCTTGAATCTATCTATGAGC
 CTGTCTTCGAGGATGTGTCTCACGGTTTCCGACCTCAGCGAAGCTGTCACACAGCTTTGAAGACAATC
 AAGAGAGAGTTCGGAG**GTA**AATTATAT**GCTTTGCCACTTCTCAA**AAGAT**CATTTAGGTT**CATTGGT
ATGTGGTTTTTTCTTAACAGGTGCAAGATGGTTTCGTGGAGGGAGATATCAAGGGATGCTTCGATAAC
 ATCGACCACGTCACACTCATCGGACTCATCAACCTTAAGATCAAGGATATGAAGATGAGCCAGTTGAT

ES 2 611 656 T3

CTACAAGTTCCTCAAGGCAGGTTACCTCGAAAACCTGGCAGTACCACAAGACTTACAGCGGAACACCTC
AGGGCGGAATCCTCTCTCTCTCTCTCGCTAACATCTATCTTCATGAATTGGACAAGTTCGTTCTCCAA
CTCAAGATGAAGTTCGACCGAGAGAGTCCAGAGAGAATCACACCTGAATACCGGGAGCTTCACAACGA
GATCAAAAAGAATCTCTCACCGTCTCAAGAAGTTGGAGGGCGAGGAGAAGGCTAAGGTTCTCTTGGAAAT
ACCAGGAGAAGAGGAAGAGGTTGCCTACACTCCCTTGTACATCACAAACAAACAAGGTTTCGTTCTCTC
CATTTTCATTCGTTTGAGTCTGATTTAGTGTTTTGTGGTTGATCTGAATCGATTTATTGTTGATTAGT
GAATCAATTTGAGGCTGTGTCCTAATGTTTTGACTTTTGATTACAGGTCTTGAAGTACGTCCGATACG
CTGACGACTTCATCATCTCTGTAAAGGAAGCAAGGAGGACTGTCAATGGATCAAGGAGCAATTGAAG
CTCTTCATCCATAACAAGCTCAAGATGGAATTGAGTGAGGAGAAGACACTCATCACACATAGCAGTCA
GCCTGCTCGTTTCTCGGATACGACATCCGAGTCAGGAGAAGTGGAACTATCAAGCGATCTGGAAAGG
TTCAATTCCTTTCTTTACATTTGTACTTGTTCACTCGTTTTATTAATCCTCTTTAGAATGGAGATTCT
TACCTCTGTGTGGCCTTTGGCAGGTCAAGAAGAGAACACTCAACGGGAGTGTGGAGCTTCTCATCCCT
CTCCAAGACAAGATCCGTCAATTCATCTTCGACAAGAAGATCGCTATCCAGAAGAAGGATAGCTCATG
GTTCCAGTTCACAGGAAGTACCTTATCCGTTCAACAGACTTGGAGATCATCACAATCTACAACCTG
AATTGAGAGGTAAGCTGCTACCTCAAACCTTTCTAGTGCTTCCATATTTCTTTCTTCTGCAAGGCAGA
GAACCATTGTGGTTAAGTGTFTTAAATTGTGAATGTATAGGTATCTGCAACTACTACGGTCTCGCAAG
TAACTTCAACCAGCTCAACTACTTCGCTTACCTTATGGAATACTCTTGCTTGAAGACTATCGCATCTA
AGCATAAGGGAACTCTCAAAGACCATCTCTATGTTCAAGGATGGAAGTGGTCTTGGGGAAATCCCT
TACGAGATCAAGCAGGGGAAGCAGAGGAGATACTTCGCCAACTTCAGTGAATGCAAATCTCCTTACCA
ATTCACTGATGAGATCAGTCAAGCTCCTGTGCTTTACGGATACGCTCGGAACACTCTTGAGAACAGAC
TTAAGGCTAAGTGTGAGCTTTGTGGAACATCTGATGAGAACACATCTTACGAGATCCACCACGTC
AACAAGGTCAAGAACCTTAAGGGAAAGGAGAAGTGGGAGATGGCAATGATCGCTAAGCAGCGGAAGAC
TCTTGTGTTGTTGCTTCCATTGTCATCGTCACGTGATCCATAAGCACAAAGTGAAGTACTAGTAA

SEQ ID

NO. 46

6. Secuencias promotoras y terminadoras utilizadas para expresión de casetes nucleares

5 6.1 Secuencias promotoras

6.1.1 Promotor de ubiquitina de Arabidopsis AtUbi3-PRO

La región promotora 5' del ubiquitina 3 de Arabidopsis se amplificó con los siguientes cebadores:

10

IM326 CGAAGCTTGAATTCTACCGATTTGGAGCCAAGTC

SEQ ID NO.47

IM327 AAGGATCCTCTAGATGTTTGGTGACCTGAAATAAACAATAG

SEQ ID NO. 48

15

Secuencia AtUbi3-PRO

TACCGGATTTGGAGCCAAGTCTCATAAACGCCATTGTGGAAGAAAGTCTTGAGTTGGTGGTAATGTAA
 CAGAGTAGTAAGAACAGAGAAGAGAGAGAGTGTGAGATACATGAATTGTCGGGCAACAAAAATCCTGA
 ACATCTTATTTTAGCAAAGAGAAAGAGTTCCGAGTCTGTAGCAGAAGAGTGAGGAGAAATTTAAGCTC
 TTGGACTTGTGAATTGTTCCGCCTCTTGAATACTTCTTCAATCCTCATATATTCTTCTTCTATGTTAC
 CTGAAAACCGGCATTTAATCTCGCGGGTTTATTCCGGTTCAACATTTTTTTTTGTTTTGAGTTATTATC
 TGGGCTTAATAACGCAGGCCTGAAATAAATTCAAGGCCCAACTGTTTTTTTTTTAAGAAGTTGCTGT
 TAAAAAAAAAAAAAGGGAATTAACAACAACAACAAAAAAGATAAAGAAAATAATAACAATTACTTTA
 ATGTAGACTAAAAAACATAGATTTTATCATGAAAAAAGAGAAAAGAAATAAAAACTTGGATCAAA
 AAAAAACATACAGATCTTCTAATTATTAACTTTTCTTAAAAATTAGGTCCTTTTTCCCAACAATTAG
 GTTAGAGTTTTGGAATTAACCAAAAAGATTGTTCTAAAAATACTCAAATTTGGTAGATAAGTTTC
 CTTATTTAATTAGTCAATGGTAGATACTTTTTTTCTTTTCTTTATTAGAGTAGATTAGAATCTTTT
 ATGCCAAGTATTGATAAATTAATCAAGAAGATAAACTATCATAATCAACATGAAATTTAAAAGAAAA
 TCTCATATATAGTATTAGTATTCTCTATATATATTATGATTGCTTATTCTTAATGGGTGGGTTAACC
 AAGACATAGTCTTAATGGAAAGAATCTTTTTGAACTTTTTCCCTTATTGATTAAATCTTCTATAGAA
 AAGAAAGAAATTATTTGAGGAAAAGTATATACAAAAAGAAAAATAGAAAAATGTCAGTGAAGCAGATG
 TAATGGATGACCTAATCCAACCACCACCATAGGATGTTTCTACTTGAGTCGGTCTTTTAAAAACGCAC
 GGTGGAAAATATGACACGTATCATATGATTCCTTCCTTTAGTTTCGTGATAATAATCCTCAACTGATA
 TCTTCCTTTTTTTGTTTTGGCTAAAGATATTTTATTCTCATTAAATAGAAAAGACGGTTTTGGGCTTTT
 GGTTTGCATATAAAGAAGACCTTCGTGTGGAAGATAATAATTCATCCTTTTCGTCTTTTTCTGACTCT
 TCAATCTCTCCCAAAGCCTAAAGCGATCTCTGCAAATCTCTCGCGACTCTCTCTTCAAGGTATATTT
 TCTGATTCTTTTTGTTTTGATTTCGTATCTGATCTCCAATTTTTGTTATGTGGATTATTGAATCTTTT
 GTATAAATTGCTTTTGACAATATTGTTTCGTTTCGTCAATCCAGCTTCTAAATTTGTCCTGATTACTA
 AGATATCGATTTCGTAGTGTTTACATCTGTGTAATTTCTTGCTTGATTGTGAAATTAGGATTTTCAAGG
 ACGATCTATTCAATTTTTGTGTTTTCTTTGTTTCGATTCTCTCTGTTTTAGGTTTCTTATGTTTAGATC
 CGTTTTCTTTGGTGTTGTTTTGATTTCTTACGGCTTTTGATTGGTATATGTTTCGCTGATTGGTT
 TCTACTTGTTCTATTGTTTTATTTACAGGTCACCAAACA

SEQ ID NO. 49

6.1.2 Promotor 35S de CaMV

5 El promotor 35S del virus mosaico de coliflor (35S-PRO) se sintetizó con base en el número de acceso GenBank AF502128

Secuencia 35S-PRO

10 TTAGCCTTTTCAATTTAGAAAGAATGCTAACCACAGATGGTTAGAGAGGCTTACGCAGCAGGTCTC
 ATCAAGACGATCTACCCGAGCAATAATCTCCAGGAAATCAAATACCTTCCAAGAAGGTTAAAGATGC

ES 2 611 656 T3

AGTCAAAAGATTTCAGGACTAACTGCATCAAGAACACAGAGAAAAGATATATTTCTCAAGATCAGAAGTA
CTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTCACAAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCT
AAAAAGGTAGTTCCCCTGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGA
CGCCGTAAAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCG
TCAACATGGTGGAGCACGACACTTGTCTACTCCAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAA
AGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTAT
CTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAG
GAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGC
ATCGTGGAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGA
CGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGACCCTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCC
ATTTGGAGAGAACACGGGGGAC

SEQ ID NO.50

6.1.3 Secuencia promotora TAF2

- 5 La región no traducida 5' en dirección 5' del gen TAF2 de Arabidopsis thaliana se sintetizó con base en la secuencia At1g73965 del genoma Arabidopsis, (www.arabidopsis.org).

GGTACCATGATCGCTTCATGTTTTATCTAATTTGTTAGCATATTGAATGATTGATTTTCTTTAATT
TGGATATGTTGATTGTCTTGTTCATCATCAATGTATGTTTTATTTAACACCGGAAGATCTTATGATG
GGTTCATTACTTCATAATAATCTCCGAGTTCTACAAGACTACAACCTTTCACGTGACTTTTACAGCGAC
AAAAAATGCATCTAGCGAAAATTAATCCACAACCTATGCATTTTTGTCACTCTTACACGCGTATGTG
CATAAATATATAGTATATACTCGACAATCGATGCGTATGTGTACACAATTACCAAACAATTATTTGA
ATATTCAGACATGGGTTGACATCACCAGTAATATTCACAGTATCTGAAAACCTATGTTTTGACATCCC
TAAATAGTTTACTAACCAGTTTAATATGAGAGCATTGTGAAGAGGCAAGAGCCATGGTTTTGTTGGC
TCGTTTAAATATGCTCATTTAACCCCCCAAAAAATACTATTAGATTTAAACGTAAAAGAATTAACGAA
CACAAGAACTGCTAAAACAAAAAAAATCAATGGCCGACATTTTCATAGTTCATACATCACTAATACTA
AAAGATGCATCATTTCACTAGGGTCTCATGAAATAGGAGTTGACATTTTTTTTTTTGTAACGACAGAAGT
TGACATGTTAAGCATCAATTTTTTTAAGAGTGGATTATACTAGTTTTTTTTTTTTTTTTTAATGTATG
GTATGATACAACAACAAAACTATAAAATAGAAAAAGTCAGTGAAACCTCAAATTGAAGGAAAACTT
TTGCACAAAAGAGAGAGAGAGAGAAAGAATGTAAATCCAAATAAATGGGCCTAATTGAGAATGCTTT
AACTTTTTTTTTTTGGCTAAAAGAGAATGCTTTAACTAAGCCATAAAATGAACATCAAACCTCAAAGG
GTAAGATTAATACATTTAGAAAACAATAGCCGAATATTTAATAAGTTAAGACATAGAGGAGTTTTAT
GTAATTTAGGAACCGATCCATCGTTGGCTGTATAAAAAGGTTACATCTCCGGCTAACATATCGGCAA
AAAGGAACCTCGAG

SEQ ID NO.51

10 6.3 Secuencias terminadoras

6.3.1 Terminador Nos

El fragmento terminador nos se sintetizó con base en el acceso de secuencia GenBank EU048864

15 Secuencia terminadora nos

TCTAGAGTCAAGCAGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGGT
 CTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTGAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCAT
 GACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCAGCAATTATAACATTTAATACGCGATAGAAA
 ACAAAAATATAGCGCGCAAACACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGACCT
 GCAG

SEQ ID NO.52

6.3.2 Terminador Ags

5 La señal polyA de agropina sintasa (terminador ags) se sintetizó con base en la secuencia GenBank EU181145.

Secuencia terminadora ags

GAATTAACAGAGGTGGATGGACAGACCCGTTCTTACACCGGACTGGGCGCGGGATAGGATATTCAGAT
 TGGGATGGGATTGAGCTTAAAGCCGGCGCTGAGACCATGCTCAAGGTAGGCAATGTCCTCAGCGTCGA
 GCCCGGCATCTATGTCGAGGGCATTTGGTGGAGCGCGCTTCGGGGATACCGTGCTTGTAAGTGAACCG
 GATATGAGGCCCTCACTCCGCTTGATCTTGGCAAAGATATTTGACGCATTTATTAGTATGTGTTAATT
 TTCATTTGCAGTGCAGTATTTTCTATTCGATCTTTATGTAATTCGTTACAATTAATAAATATTCAAAT
 CAGATTATTGACTGTCATTTGTATCAAATCGTGTTTAATGGATATTTTATTATAATATTGATGAT

SEQ ID NO. 53

10

Parte 2 - Métodos de transformación de plantas y mapas de vectores

15 La transformación de plantas se llevó a cabo utilizando construcciones con base en los vectores binarios pGreen0029 y pSOUP (números de acceso de GenBank EU0490266, EU048864 y EU048870) (Hellens et al, 2000, Plant Mol. Biol 42: 819-832). El vector pSOUP-0179 es el que lleva el T-ADN del vector pGreen0179 (número de acceso GenBank EU048866) en el vector pSOUP (número de acceso GenBank EU048870)

1. Transformación de plantas de tabaco

20 1.1. Se realizó la transformación de plantas de tabaco como se describe por Horsch et al (1985) (Science 227: 1229-1231) utilizando la cepa de Agrobacterium AGL1.

Se seleccionaron transformantes vegetales en el medio de regeneración suplementado con Kanamicina 300 mg/l y/o Higromicina 30 mg/l.

25

1.2 Vectores para transformación de mitocondrias de tabaco

1.2.1 Vectores generales para expresión de transgenes en mitocondrias

30 - Expresión que utiliza un promotor heterólogo

La región promotora ATP6 de mitocondrias de Arabidopsis thaliana (AtmATP6-PRO) se puede utilizar para dirigir la expresión de transgenes en mitocondrias de tabaco.

35 El gen que codifica el GFP se clonó entre AtmATP6-PRO y la secuencia terminadora ATP6 de tabaco (NtmATP6-TER). Esta construcción de expresión del transgen se clonó entre NtmLFS1 y NtmRFS1 en dirección 5' de PCD para formar la unidad de transformación de mitocondrias (MTU). La secuencia mLTRASi se colocó bajo el control del promotor AtUbi3 y el terminador ags y se clonó en el pGreen0029 junto con la unidad de transformación de mitocondrias para generar el vector M21 (Figura 3).

40

Las mitocondrias dirigidas a mRTRHi-Ty1 de transcriptasa RNasa H inversa se colocó bajo el control del promotor TAF2 y el terminador ags y se clonó en el vector pSOUP-0179 para generar el vector M28 (Figura 3).

45 Las construcciones M21 y M28 se cotransformaron en la cepa AGL1 de Agrobacterium y utilizaron para transformación de Nicotiana tabacum.

Las líneas transgénicas se recuperaron en el medio de selección complementado con 300 mg/l de Kanamicina y/o 30 mg/l de Higromicina:

5 - Expresión mediante fusión traduccional con un gen mitocondrial natural

El NtmLFS4 corresponde al extremo 5' del gen que codifica ATP6 y se puede utilizar para fusión traduccional con cualquier gen de interés, se proporciona la actividad del promotor por el promotor ATP6 en dirección 5' de NtmLFS4 luego de inserción en el genoma mitocondrial de tabaco y la terminación de la transcripción se logra con la secuencia terminadora ATP6 dentro de NtmRFS4. El gen que codifica GFP se fusionó a NtmLFS4 y se clonó junto con NtmRFS4 y PBD en el dominio IV del intrón LtrBM para formar la unidad de transformación de mitocondrias (MTU). La secuencia mLTRASi se colocó bajo el control del promotor AtUbi3 y el terminador ags y se clonó en el pGreen0029 junto con la unidad de transformación de mitocondrias para generar el vector M22 (Figura 4).

15 Las construcciones M22 y M28 se cotransformaron en la cepa de Agrobacterium AGL1 y se utilizaron para transformación de Nicotiana tabacum.

Las líneas transgénicas se recuperaron en medio de selección suplementado con 300 mg/l de Kanamicina y/o 30 mg/l de Higromicina.

20 1.2.2 Construcción que induce esterilidad masculina citoplasmática (CMS)

La unidad de transformación de mitocondrias de tabaco que induce CMS que contiene NtmLFS3, PCFM, NtmLFS3 y dominio de unión de cebador (PBD) se insertó en el dominio IV del intrón LtrBM. El fragmento de ADN resultante se fusionó con el promotor 35S y el terminador nos y se introdujo en el vector binario pGreen0029. La secuencia mLTRASi se colocó bajo el control del promotor AtUbi3 y el terminador ags y se clonó en el pGreen0029 junto con la unidad de transformación de mitocondrias para generar el vector M24 (Figura 5).

30 Las construcciones M24 y M28 se co-transformaron en la cepa AGL1 de Agrobacterium y se utilizaron para transformación de Nicotiana tabacum.

Las líneas transgénicas se recuperaron en medio de selección suplementado con 300 mg/l de Kanamicina y/o 30 mg/l de Higromicina.

35 2. Transformación de Arabidopsis Thaliana

2.1. Se realizó la transformación de plantas de Arabidopsis como se describe por Clough y Bent (Clough and Bent (1998) Plant Journal 16: 735-743). La cepa GV3101 de Agrobacterium tumefaciens (Koncz & Schell (1986) -Mol Gen Genet 204: 383-396) se utilizó para transformación. El fragmento de ADN resultante se fusionó con el promotor 35S y terminador nos y se introdujo en el vector binario pGreen0029.

40 2.2 Vectores para transformación de construcciones que inducen esterilidad citoplasmática masculina (CMS) en mitocondrias de Arabidopsis thaliana

45 La unidad de transformación de mitocondrias de Arabidopsis que inducen CMS que contiene AtmLFS5, PCFM, AtmLFS5 y dominio de unión de cebador (PBD) se insertó en el dominio IV del intrón LtrBM. El fragmento de ADN resultante se fusionó con el promotor 35S y el terminador nos y se introdujo en el vector binario pGreen0029. La secuencia mLTRASi se colocó bajo el control del promotor AtUbi3 y el terminador ags y se clonó en el pGreen0029 junto con la unidad de transformación de mitocondrias para generar el vector M27 (Figura 6).

50 Las construcciones M27 y M28 (Figura 3) se cotransformaron en la cepa GV3101 de Agrobacterium y se utilizaron para la transformación de Arabidopsis (Col-0).

55 Las líneas transgénicas se recuperaron en medio de selección suplementado con 300 mg/l de Kanamicina y/o 30 mg/l de Higromicina.

Parte 3 - Resultados

60 La transformación de Nicotiana tabacum y Arabidopsis con nuestros vectores que contienen casetes de transgén generaron plantas transgénicas. En todos los casos hemos sido capaces de detectar la inserción del casete del transgén en el genoma de mitocondrias utilizando amplificación por PCR de las regiones de unión.

65 Se analizaron cinco líneas transgénicas independientes para cada construcción. Los análisis moleculares que incluyen la secuenciación de las uniones de inserción mostraron que hubo inserción correcta en el genoma mitocondrial en 80% de las plantas transformadas.

Adicionalmente, se generaron plantas de tabaco estériles masculinas transformadas con el marco de lectura abierto PCF que induce CMS de la mitocondria de petunia (Figura 7).

Sección experimental 1B

5

Las modificaciones del método de transformación de mitocondrias descritas en la sección experimental 1A se pueden mejorar utilizando PBD diseñado para transcripción inversa en el citoplasma o en las mitocondrias, y al volver a posicionar los elementos fundamentales del casete de transformación (Figura 8).

10

Un grupo de construcciones se preparó para transformación del tabaco y arroz con intrón LtrB (LtrB-MTS) como la MTS (figura 9-10). El posicionamiento de los elementos fundamentales del casete de transgén se diseñó como se describe en la Figura 8, A-B.

El PBD-MIT se diseñó como se describió anteriormente.

15

PBD-MIT

TATCTCACATTACCCAATTGTCATGGTACCTACTGTGCATTGGATACTTCTAAGGAAGTCCACACAA
 ATCAAGAACCATTAGACGTTTCATCTAACCAAACAGAAGAATGTGAGAAGGCTTCCACTAAGGCTAAC
 TCTCAACAGACAAC

SEQ ID NO.41

20

Se utilizó el dominio de unión de cebador del retrotransposón tnt1 de tabaco como el PBD-CYT, y se amplificó a partir de ADN genómico de tabaco cv Petit Gerard utilizando los siguientes cebadores:

AS912 gccgcggtttattaccgtgaatatta

SEQ ID NO. 54

25

AS913 cgcgccgctctgataagtcaacctgatt

SEQ ID NO. 55

PDB-CYT

CTTTATTACCGTGAATATTATTTGGTAAGGGGTTTATTCCCAACAACACTGGTATCAGAGCACAGGTTTC
 TGCTCGTTCCTGAAATACTATTCACTGTTCGGTAGTACTATACTTGGTGAAAAATAAAAATGTCTGGA
 GTAAAGTACGAGGTAGCAAAATTCATGGAGATAACGGTTTCTCAACATGGCAAAGAAGGATGAGAGA
 TCTGCTCATCCAACAAGGATTACACAAGGTTCTAGATGTTGATTCCAAAAAGCCTGATACCATGAAAG
 CTGAGGATTGGGCTGACTTGGATGAAAGAGCTGCTAGTGCAATCAGGTTGCACTTATCAGA

SEQ ID NO.56

30

En el primer caso, el PBD-MIT se fusionó al extremo 3' del intrón LtrB (figura 8A, figura 9A para el tabaco y figura 10A para el arroz). Como la proteína LtrA posee tanto la característica de unión LtrB-MTS como la actividad de transcripción inversa se pueden cumplir ambas funciones de (i) translocación de ARN de transgén en las mitocondrias y (ii) transcripción inversa del casete de ARN utilizando mitocondrial tARN-Met como cebador.

35

En el segundo caso, el PBD-CYT se fusionó a MTU (Figura 8B, Figura 9B para el tabaco y figura 10B para el arroz), de tal manera que se inicia la transcripción inversa del casete del transgén y se realiza mediante transcriptasas inversas endógenas en el citoplasma utilizando tARN-Met citoplasmático. La proteína LtrA sirve como la proteína de unión a MTS para translocación de complejos de ARN: ADN iniciados por transcriptasas inversas citoplasmáticas en las mitocondrias.

40

Construcción M45 de PCF de arroz

Los cebadores utilizados para amplificar la secuencia de flanqueo izquierda de mitocondrias de arroz (osLFS) para la inserción del marco de lectura abierto PCF:

45

IM416 ggatccatcgagccattgaagcag

SEQ ID NO. 57

IM417_gcatgctcaatctgtccttgg

SEQ ID NO.58

50

osLFS

ES 2 611 656 T3

ggattcatatcgagccattgaagcagcgcgtcgggctacaatcgggcaattccatcgtgctatgagcg
gacaattccgaagaaattgtaagatatgggtaagagttctcgcagatcttccattacggggaaaccc
gcagaagtccgaatgggaagaggaaaaggaaatcctacgggttgattgctcgtgtgtccacgggaca
aatcccatttgaaatggatggtgtgagtttgtcaaatgctcgacaagccgctagattagcgggcgata
aaccatgttcgtcaaccaagtttgttcagtggtcgtaacgtaattggttagtggggaaaaaccgggcc
gggactcaaaagaatttgcggaagtgtttgttccctgaacgaggggaagtggaaagacaaagagggatag
ggagctcgctcctctcttttttgaatcgccgaaattgtaacgacgaccttcttgttccaggcatacg
actctgagacgtgacgggtgtcacttttccggcccggtaaagtgacagttatataaataagaataagaa
agagaagcgtgatgttgtcagcaatcaaattatcgtaaatagatagtagcggttgctgttgtttcaattt
ctgttcgtcggctccttgggttacgaaggtgtgggcttactaatacggagaggggtccgaatgataaag
tgtcatgaaagttcgtgaaagaatgttcttgttttctgttggaaaacccaacgccacggccacaaaac
gaaaaagtctcccgtttgttttgggagcagagctttaaaggatagttaccctatgatgagattta
gttcaacggataagaaggatagaagaaatatgctatttctgctattccatctatttgtgcattcagt
gctgccgttcccccgccccaaaggacaagattgagcatgc

SEQ ID NO.59

Cebadores utilizados para amplificar la secuencia de flaqueo izquierda de mitocondrias de arroz (osRFS) para inserción del marco de lectura abierto PCF:

5

IM418 ttctagagtcgccgctatcacttt

SEQ ID NO.60

IM419 ccgcggaagactatagaatgttcc

SEQ ID NO.61

10

osRFS

ttctagagtcgccgctatcacttttttggggggccaatcccggaagagttatggaaagattttata
gctcaattgaatgaagaaagtgaattcatggacaacatttttttgggtgtttacaacgcgagaaacgg
ctatgaaagcggccacagttcttcagggaaatcggatagatttagcgataaacggctatgaaagtgc
ttttgtcggaaatttgcacctatttgtatctatttagtgatcagtcgcgctagtttctttgattccactc
gggtgttccctttccatttgcctccaatagttcgacctatccagaaaaattgtcggcctacgaatgtgg
tttcgatccctccgggtgatgccagaagtcgtttcgatatacgattttatccgggttccctattttatta
ttatccctgatctggaagtcaccttttttttcccttgggcagtacctcctaacaagattgatctgttt
ggatcttgggtccatgatggcctttttattgattttgacgattggatttctctatgaaatggaaaagggg
tgcttcggatcgggagtaaccactagtgaaggggcaaggggggaaggacataggaaagagggatgcc
tacaanaaatcaattgattcgtcatggtagagaagaaaaacagcgcacggaccgtactcgagcttcgg
atcaatgtcccaaaagcaaggagtagcctgctgtttcgcgagagaacaccgaaaaaacctaattca
gctctacgtaagatagcaaaagtagcgggtgagcaatcgacatgatataatttgcacattccaggcgga
aggtcataattcgcaggaacattctatagcttagccgcgcc

SEQ ID NO.62

El gen LtrA se accionó por el promotor de arroz actina1 amplificado utilizando los siguientes cebadores:

15

ARP1 gtcatcatatgcttgagaaga

SEQ ID NO.63

ARP2 gcctacaaaaagctccgcacg

SEQ ID NO. 64

Secuencia promotora act1 de arroz

gtcattcatatgcttgagaagagagtcgggatagtcctaaataaaacaaaggtaagattacctgggtca
 aaagtgaaaacatcagttaaaagggtggtataagtaaaatatcggtataaaaagggtggcccaaagtgaa
 atttactcttttctactattataaaaattgaggatgttttgtcggtagctttgatcgtcatttttgta
 tgaattggtttttaagttttattcgcgatttggaatgcatatctgtatttgagtcggtttttaagttc
 gttgcttttgtaaatacagagggattttgtataagaaatatctttaaaaaacccatagctaatgtgac
 ataatttttgagaaaaatatattcaggcgaattccacaatgaacaataataagattaaaatagctt
 gccccggtgcagcgtgggtatttttctagtaaaataaaagataaaacttagactcaaaacatttac
 aaaaacaaccctaaagtcctaaagcccaaagtgctatgcacgatccatagcaagcccagcccaacc
 aaccaaccaaccaaccagtcgagccaactggcaaatagctctccacccccggcactatcacctgtg
 agttgtccgcaccaccgcacgtctcgcagccaaaaaagaaagaaaaaagaaaaagaaaa
 acagcaggtgggtccgggtcgtgggggcccggaaaagcaggaggatcgcgagcagcgcagggcccgg
 ccctccctccgcttccaaagaaacgcccccatcgccactatatacatccccccctctctcccat
 ccccccaaccctaccaccaccaccaccaccacctctccccctcgtgcccggacgacgagctcctcc
 cccctccccctccgcccgcggtaaccaccccgccctctctcttttctcgttttttttt
 5 cgtctcgggtctcgatctttggccttggtagtttgggtgggagagcggcttcgtcgcccagatcggg
 ggcgagggggggggagatctcgcggctggcgtctccgggctgagtcggcccggatcctcgcggggaa
 tggggctctcggatgtagatctcgcgatccgctgtttgggggagatgatgggggtttaaatttcc
 gccatgctaaacaagatcaggaagaggggaaaagggcactatggtttatatttttatatatttctgct
 gcttcgtcaggcttagatgtgctagatcttctttctttctttttgtggtagaatttgaatccctc
 agcattgttcatcggtagtttttcttttcatgatgttgacaaatgcagcctcgtgaggagcttttt
 gtaggc

SEQ ID NO. 65

Transformación de embriones inmaduros de arroz.

10

División de embriones inmaduros

Día 1:

15

Retire las semillas inmaduras de fase lechosa/post-lechosa de panículas (se desean embriones inmaduros de 1-2 mm en tamaño).

Semillas inmaduras esterilizadas: hipoclorito de sodio al 50% (12%) + 1 gota de tween 20. Agitar 10 min.

20

Enjuague 3-5x en agua desionizada estéril. Escorra el exceso de agua. Semillas en alícuotas (alrededor de 40) en placas de Petri estériles.

25

Configure una placa de Petri de 60 x 15 mm que contenga una solución al 50% de hipoclorito de sodio y próxima a esta un vaso de precipitados estéril a su lado con un papel de filtro estéril en este. El uso de fórceps estériles para retirar de forma aséptica las glumas de la primera semilla. Sumerja esta semilla en el hipoclorito de sodio al 50%. Retire las glumas de una segunda semilla y sumerja la segunda semilla en la solución de hipoclorito de sodio, mientras que retira la primera semilla y almacena esta semilla descascarillada/esterilizada sobre el papel de filtro en el vaso de precipitados. Continúe.

30

Después se retiran todas las glumas:

ES 2 611 656 T3

Esterilice las semillas descascarilladas: hipoclorito de sodio al 50%: 5 min. con agitación.

Enjuague: 5-7 x en agua desionizada estéril, escurra.

5

Coloque todas las semillas en una gran placa de Petri estéril. Alícuotas para división de embriones (para mantener las semillas secas, trabajar sólo con 50-100 en la placa a la vez dejando el resto en la placa maestra).

10

Retire el embrión de cada semilla y coloque el embrión, el escutelo hacia arriba, en una placa de Petri de 90 x 15 mm que contiene un medio de proliferación (40-50 embriones/placa). Cultive en 28°C en la oscuridad durante 2 días antes del bombardeo Día 3: Llegada cada embrión de contaminación antes de bombardeo

Día 3

15

Verifique cada uno de los embriones desde el medio de proliferación. Distribuya 35 a 40 escutelo de embriones hacia arriba en un área de 1 cm² en el centro de una placa objetivo de 60 x 15 mm que contiene 10 ml de medio de proliferación + osmótico (0.6 M). Verifique cada placa objetivo de tal manera que el escutelo esté recto. Permita suficiente espacio de tal manera que el escutelo no produzca sombra entre sí.

20

Bombardeo:

Pistola

14 kV

1^{er} bombardeo
2^{do} bombardeo

vacío: 25 pulgadas de Hg
4 horas después de tratamiento osmótico
4 horas después del 1^{er} bombardeo

25

Día 4:

4 a 16 horas después los 2dos embriones inmaduros de transferencia de explosión a medio de proliferación sin osmótico. Cultivo en la oscuridad a 28°C durante 2 días.

30

Selección:

Día 5:

35

Corte asépticamente con tijeras el brote de germinación. Transfiera de 16-20 embriones inmaduros a medio de proliferación fresco que contiene 30-50 mg/l de Higromicina (dependiendo del genotipo); cultive en la oscuridad a 28°C; número de embriones total récord.

40

Después de 10 días retire cuidadosamente el callo desde el escutelo al romperlo en 2-10 trozos pequeños; subcultive en medio de proliferación fresco + higromicina. No subcultive tejido marrón ni el embrión inmaduro restante que podría inhibir el crecimiento adicional de callos sanos.

Subcultive cada 10 días al seleccionar tejido sano: (embriogénico si está presente) y transfiera a medio de proliferación fresco + higromicina. Retire el callo marrón, ya que se podría inhibir a callo embriogénico.

45

30 a 40 días después del bombardeo cambie el procedimiento de selección. En lugar de eliminar el tejido de aspecto malo mantenga solo el tejido embriogénico (elimine el tejido no embriogénico sano)

Regeneración:

50

Después de 40 a 60 días, transfiera el callo embriogénico establecido que muestra crecimiento diferencial en medio de proliferación + higromicina al medio de regeneración + higromicina. Cultive a 28°C bajo poca luz durante 10 días después con mucha luz durante 10 días adicionales. Verifique las placas periódicamente a la luz para el desarrollo de embriones y brotes verdes. A medida que los brotes se desarrollan a veces es beneficioso mover suavemente el brote en desarrollo lejos del callo originado de y retirado del tejido muerto del brote en sí mismo para evitar la inhibición del crecimiento.

55

Germinación:

60

Transfiera los embriones compactos blancos y brotes verdes que inician en las raíces al medio de germinación bajo mucha luz a 28°C durante 1 a 2 semanas. Verifique las placas periódicamente. Elimine el tejido necrótico y divida los embriones que germinan si es necesario.

Resultados

5 Se realizó la transformación de *Nicotiana tabacum* y arroz con los vectores con base en intrón del grupo II que contienen casetes de transgén para transformación del genoma mitocondrial.

10 Se analizaron siete a diez líneas transgénicas independientes para cada construcción. Los análisis moleculares que incluyen la secuenciación de uniones de inserción mostraron que hubo una inserción correcta en el genoma mitocondrial en 80% de las plantas transformadas. La inserción del marco de lectura abierto PCF en las mitocondrias vegetales se correlacionó con un fenotipo de esterilidad.

El análisis de plantas transgénicas se realizó utilizando PCR para secuencias de flanqueo utilizando los siguientes pares de cebadores:

15 Para el tabaco:

ntLFS3F cccaagttacagcgggctct SEQ ID NO. 66

20 PCFMR tatggggctccctgtcgag SEQ ID NO.67

PCFMF gcagcaccaaaattgagcct SEQ ID NO. 68

ntRFS3R cgagttccagaggcatcttc SEQ ID NO.69

25 Para arroz:

osLFSF actgaatgcggaagtatgg SEQ ID NO.70

30 PCFMR tatggggctccctgtcgag SEQ ID NO.71

PCFMF gcagcaccaaaattgagcct SEQ ID NO.72

osRFSR tagggctactagaaagagga SEC ID No. 73

35

Reivindicaciones

1. Un método para transformar una célula vegetal, el método comprende:

5 1) introducir en el núcleo de dicha célula vegetal una primera secuencia de ácidos nucleicos que comprende un promotor nuclear vegetal ligado operablemente a una primera secuencia de ácidos nucleicos que comprende un casete de transgén de mitocondria vegetal, una secuencia de translocación de mitocondrias vegetales que es una secuencia de ARN capaz de ser unida a una proteína de unión de secuencia de translocación de mitocondrias vegetales, y un dominio de unión de cebador seleccionado de aquel de un retrotransposón o de un retrovirus;

10 2) introducir en el núcleo de dicha célula vegetal una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de unión de secuencia de translocación fusionada a un péptido de tránsito de mitocondria vegetal, en el que dicha segunda secuencia de ácidos nucleicos se liga operablemente a un promotor nuclear vegetal; y

15 3) introducir en el núcleo de dicha célula vegetal una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína transcriptasa inversa fusionada a un péptido de tránsito de mitocondria vegetal, en el que la tercera secuencia de ácidos nucleicos se liga operablemente a un promotor nuclear vegetal que acciona la expresión en un núcleo de célula vegetal;

20 en el que el casete de transgén de mitocondria vegetal comprende:

i) una secuencia de flanqueo izquierda y una secuencia de flanqueo derecha seleccionada de secuencias de nucleótidos utilizadas para recombinación homóloga en la mitocondria; y

25 ii) por lo menos un ácido nucleico aislado de interés.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el casete de transgén de mitocondria vegetal comprende por lo menos un promotor específico a mitocondria y por lo menos una secuencia terminadora específica de mitocondria.

30 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicha secuencia de ácidos nucleicos aislada es una secuencia de ADN recombinante (por ejemplo cADN) o una secuencia de ADN introducida natural, genómica aislada preferiblemente seleccionada de secuencias aisladas de ácidos nucleicos de vegetales o mamíferos.

35 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la secuencia de ácidos nucleicos aislada se selecciona de proteínas que confieren esterilidad masculina citoplasmática a una planta tal como la secuencia pcf de mitocondria de petunia, secuencia orf107 de sorgo y orf 79 de arroz.

5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el dominio de unión de cebador se selecciona del retrotransposón Ty de levadura, y el retrotransposón de tabaco TnT1.

40 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia MTS se selecciona de virus de ARN s, dominios de unión de proteína de envoltura viral, ARN de intrón del grupo I y grupo II, sitios de unión de cebador de retrotransposón, o ARN que aloja un dominio que se reconoce por las proteínas de unión de ARN tal como el MTS derivado de intrón del grupo II del intrón IITRB de lactococcus lactis.

45 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia de ácidos nucleicos de transcriptasa inversa de mitocondria se selecciona de ARN de retrotransposón o ARN retroviral tal como el retrotransposón Ty1 de levadura y es transcriptasa-RNasa H inversa.

50 8. Un método para producir por lo menos una especie de ARN heterólogo o exógeno en una planta que comprende:

1) introducir en una célula vegetal que se puede regenerar una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un promotor nuclear vegetal ligado operablemente a una primera secuencia de ácidos nucleicos que comprende un casete de transgén de mitocondria vegetal, una secuencia de translocación de mitocondrias vegetales, y un dominio de unión de cebador;

55 2) introducir en dicha célula vegetal que se puede regenerar una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de unión de secuencia de translocación fusionada a un péptido de tránsito de mitocondria vegetal, en el que dicha segunda secuencia de ácidos nucleicos se liga operablemente a un promotor nuclear vegetal; y

60 3) introducir en dicha célula vegetal que se puede regenerar una tercera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína transcriptasa inversa fusionada a un péptido de tránsito de mitocondria vegetal en el que la tercera secuencia de ácidos nucleicos se liga operablemente a un promotor nuclear vegetal;

65 4) cultivar dicha célula vegetal que se puede regenerar de las etapas 1) a 3);

5) seleccionar una célula vegetal de (4) en la que el transgén comprendido dentro del casete de transgén de mitocondria vegetal se integra en el genoma de la mitocondria;

6) regenerar una planta a partir de la célula vegetal de (5); y

7) cultivar la planta de (6).

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la especie de ARN heterólogo o exógeno codificado por el transgén que se integra en la mitocondria se expresa como una proteína heteróloga o exógena.

10. Uso de una secuencia de polinucleótidos aislada que comprende un promotor nuclear vegetal ligado operablemente a una primera secuencia de ácidos nucleicos que comprende un casete de transgén de mitocondria vegetal, una secuencia de translocación de mitocondrias vegetales, y un dominio de unión de cebador en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9.

11. Uso de una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica una proteína de unión de secuencia de translocación de mitocondrias fusionada a un péptido de tránsito de mitocondria vegetal en el que la secuencia de polinucleótidos se liga operablemente a un promotor nuclear vegetal en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

12. Uso de una secuencia de polinucleótidos aislada que codifica una proteína transcriptasa inversa fusionada a un péptido de tránsito de mitocondria vegetal en el que la secuencia de polinucleótidos se liga operablemente a un promotor nuclear vegetal en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

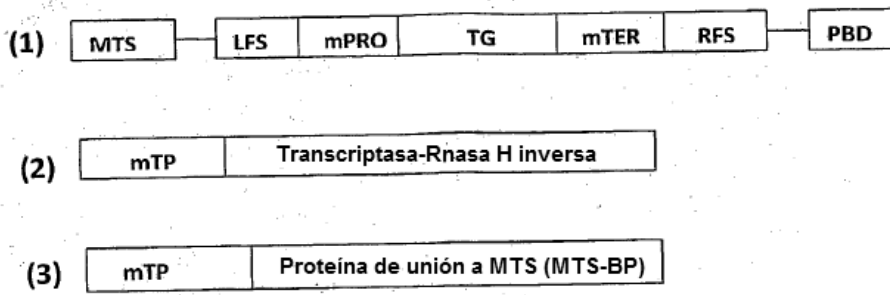


Figura 1

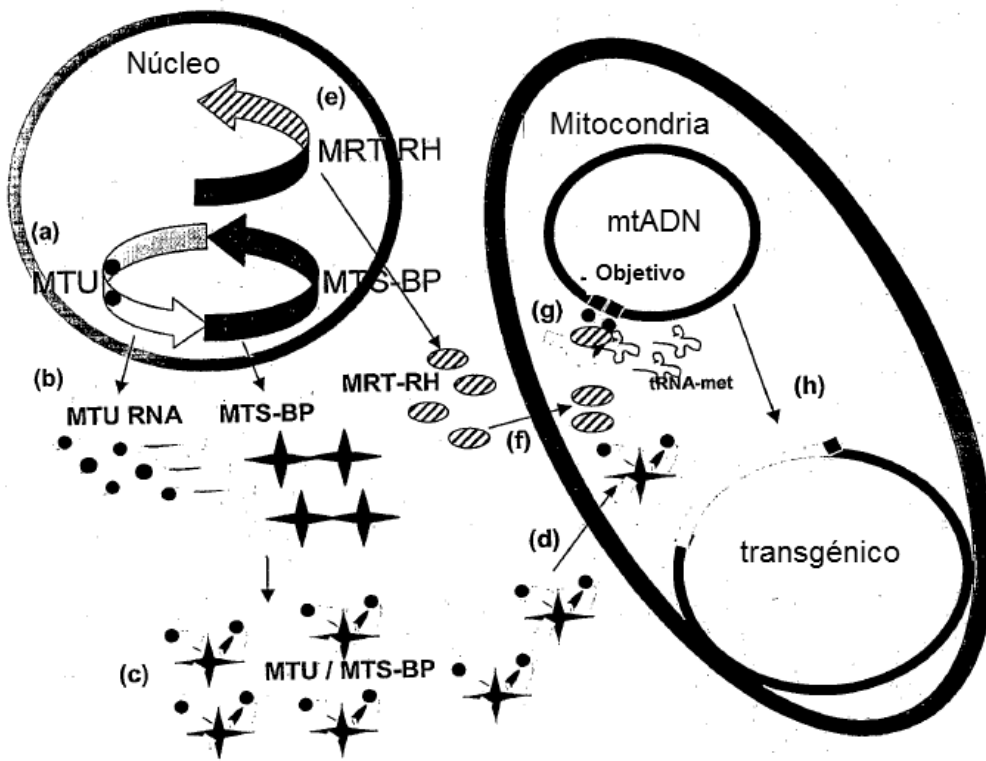


Figura 2

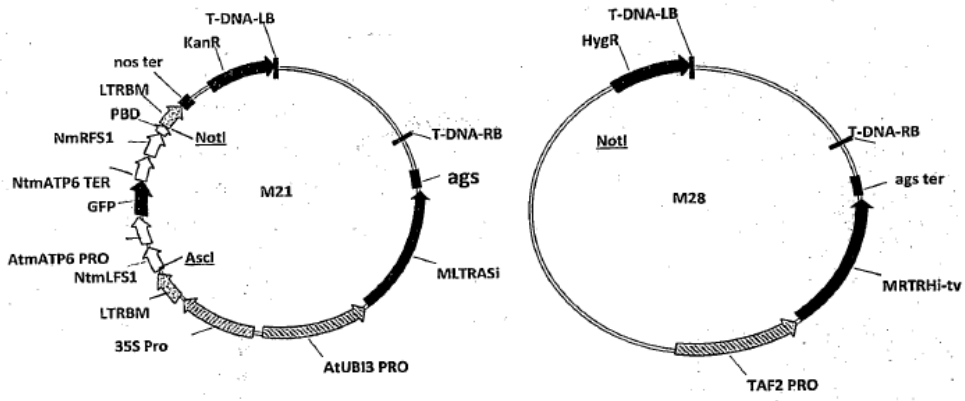


Figura 3

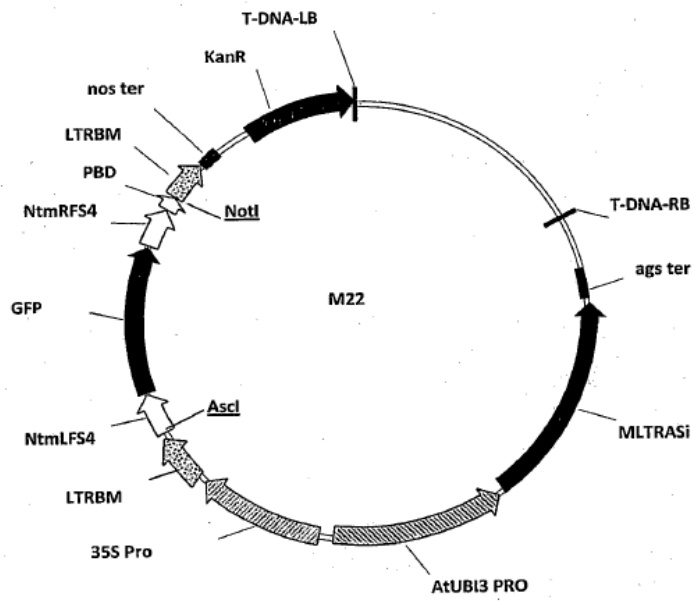


Figura 4

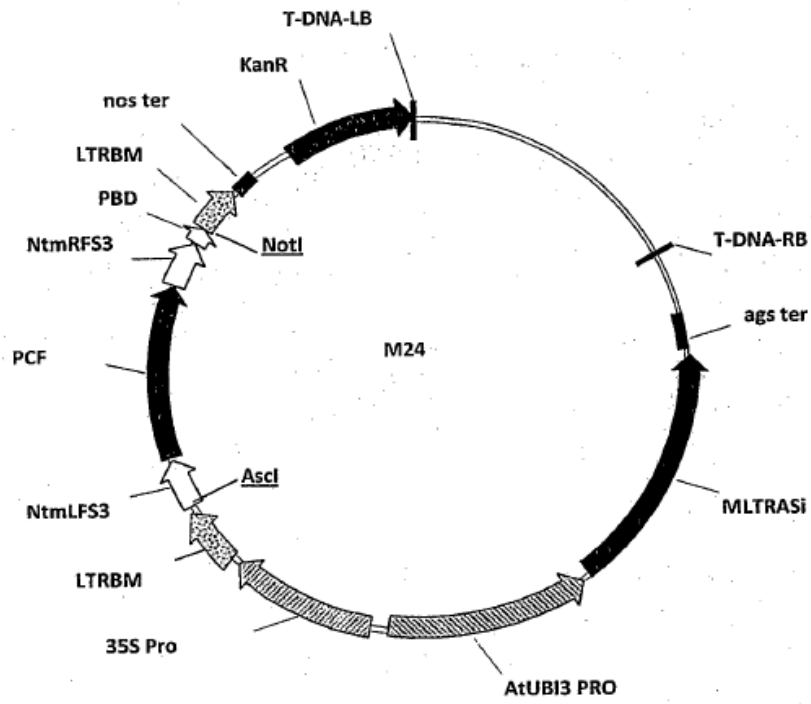


Figura 5

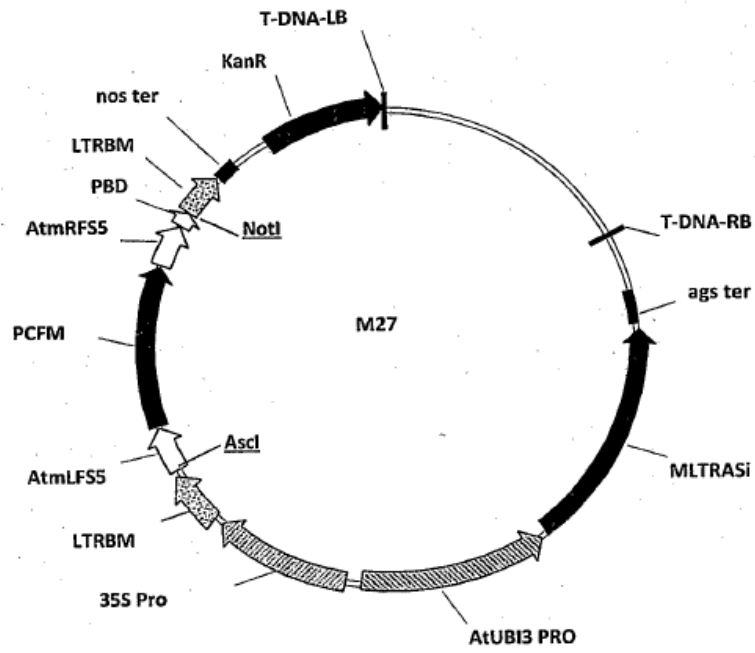


Figura 6

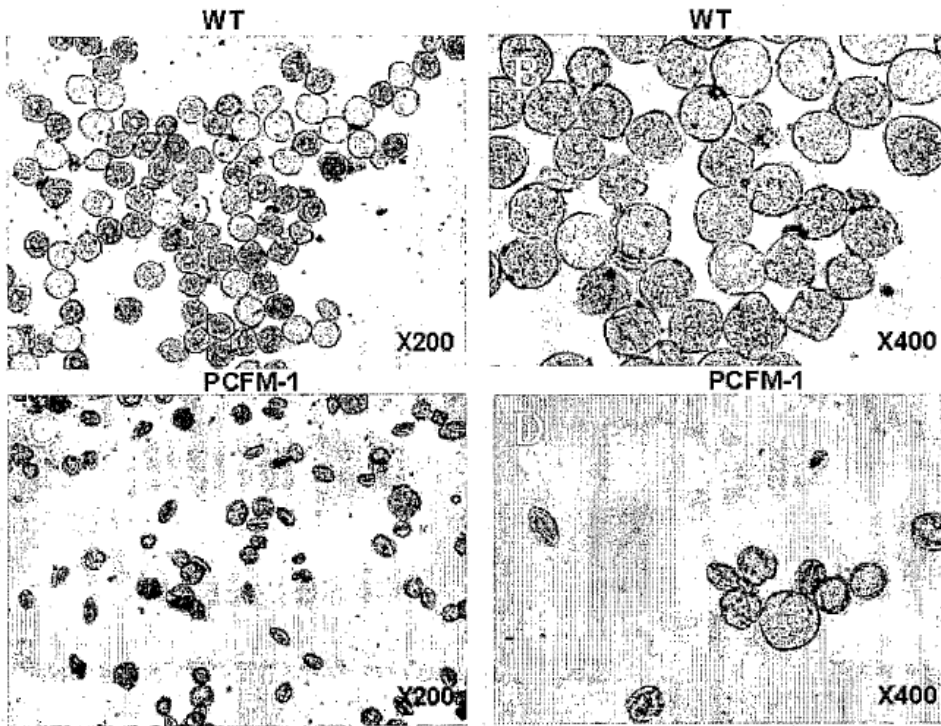


Figura 7

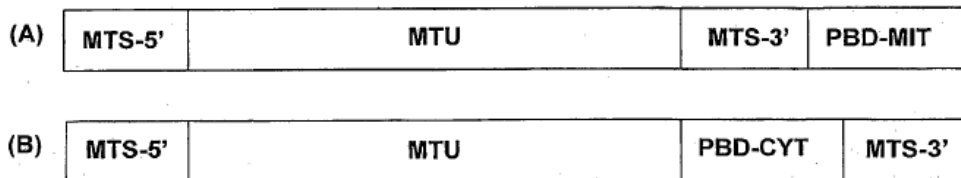


Figura 8

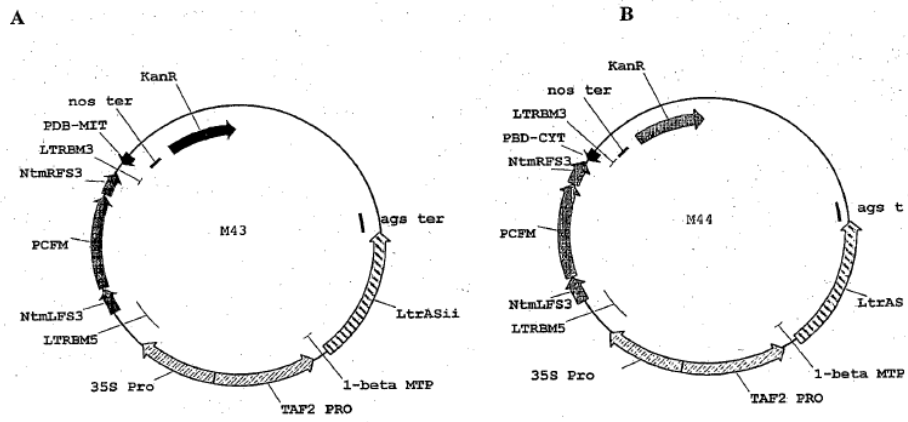


Figura 9

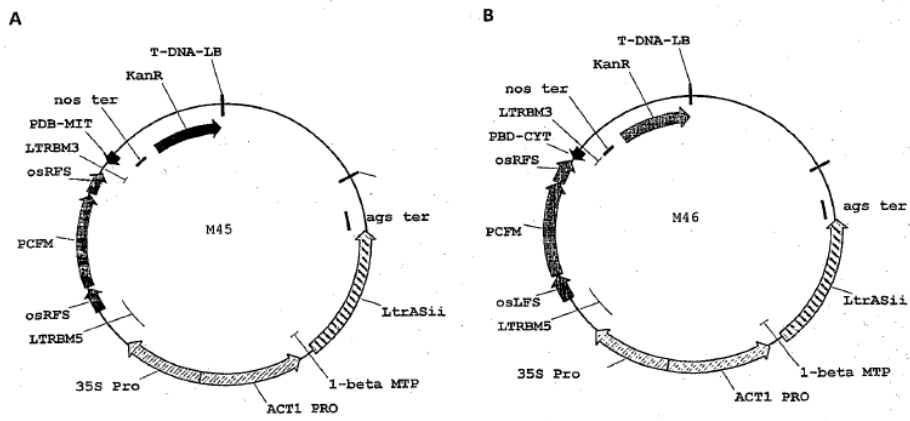


Figura 10