**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análise de homoplasma de plantas transplastômicas de fumo via
PCR em tempo real**

Simone Missae Tanaka

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

**Piracicaba
2011**

Simone Missae Tanaka
Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas

**Análise de homoplasma de plantas transplastômicas
de fumo via PCR em tempo real**

Orientador:
Profa. Dra. **HELAINÉ CARRER**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Tanaka, Simone Missae

Análise de homoplasmia de plantas transplastômicas de fumo via PCR em tempo real / Simone Missae Tanaka. - - Piracicaba, 2011.
68 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Cloroplastos 2. Transformação genética 3. Fumo 4. Genomas 5. Plastídeos
6. Reação em cadeia por polimerase I. Título

CDD 633.71
T161a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Augusto e Elizabeth,
e minhas irmãs, Suzi e Samira,
por todo amor e incentivo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Profa. Dra. Helaine Carrer, pela orientação, pelos ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

Ao Dr. Marcelo Rogalski, pela amizade, dedicação e pelas valiosas contribuições ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Daniel Alves Ramiro, pela disponibilidade e pela contribuição na realização das análises da PCR em tempo real.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Gallo, por ter me acolhido no laboratório.

Aos professores, pela contribuição na minha formação profissional.

Ao Dr. Enio Tiago de Oliveira, pela amizade, pelos auxílios e ensinamentos, pelas horas de descontração e risadas.

À Msc. Valentina Fátima de Martin, pela amizade, pelos ensinamentos e pela disposição em ajudar.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Maria Solizete Granziol Silva, pela atenção, dedicação, simpatia e disponibilidade em sanar todas as dúvidas.

Aos colegas do curso, pela amizade, pelos trabalhos e angústias compartilhadas.

Aos colegas de laboratório, André Barbosa, Andres Ortiz, Carol Zakir, Daniela Silva, Esteban Galeano, Flávio dos Santos, Gabriel Lopes, Lucas da Silva, Maísa

Heluany, Marcelo Ambrosano, Mariana Barbosa, Martha Chaddad, Olehg Rojas, Renato Barbosa, Tatiana Bistaco e Vanessa Mourão pelos auxílio e pelo agradável convívio no ambiente de trabalho.

Aos meus pais, Augusto Setsuo Tanaka e Elizabeth Nobuko Ikedo Tanaka, por todo o apoio, amor, incentivo, confiança e todos os ensinamentos sobre a vida. Sem vocês, essa conquista não seria possível.

Às minhas irmãs, Suzi Mayumi Tanaka e Samira Mari Tanaka, pela amizade e companheirismo mesmo a distância, por fazerem meus dias de descanso mais felizes.

Ao meu grande companheiro Gabriel Silva Daneluzzi, por toda a força e paciência, pelo amor, medos e sonhos compartilhados; e à sua família, pelo incentivo e carinho.

Às minhas amigas de longa data, Daniele Izilda, Denise Calheiros, Giovana Shigihara, Kaline Porto, Lays Leonel, Letícia Watanabe, Lívia Kawabe, Mayara Nomura, Maylane Santos, Natália Daneluzzi, Natália Guimarães, Noéle Renó, Winne Tsunomachi e Yukari Mano pela amizade e carinho, pelas lembranças, horas de descontração e risadas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“Você pode encarar um erro como uma besteira a ser esquecida,
ou como um resultado que aponta uma nova direção”.

Steve Jobs

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Características do genoma plastidial.....	19
2.2 Transformação genética do genoma plastidial.....	20
2.3 Alteração na via biossintética dos ácidos graxos em plantas.....	25
2.4 Análise de homoplasma de plantas transplastômicas.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Material vegetal.....	31
3.2 Vetores de transformação.....	31
3.3 Transformação do genoma plastidial e seleção de plantas transplastômicas.....	32
3.4 Extração de DNA.....	33
3.5 Análise da presença do transgene por PCR.....	34
3.6 Teste de germinação.....	35
3.7 Teste de homoplasma por PCR.....	35
3.8 Teste de homoplasma por PCR em tempo real.....	35
4 RESULTADOS.....	39
4.1 Transformação do genoma plastidial e seleção de plantas transplastômicas por PCR.....	39
4.2 Teste de germinação.....	40
4.3 Teste de homoplasma por PCR.....	42
4.4 Análise do grau de homoplasma via PCR em tempo real.....	42
4.5 Análise de plantas transplastômicas com genes ω -3 <i>elongase</i> (pMR5) e Δ 12/ ω 3 <i>desaturase</i> (pMR10).....	46
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS.....	55

RESUMO

Análise de homoplasma de plantas transplastômicas de fumo via PCR em tempo real

A transformação plastidial oferece uma série de vantagens em relação à transformação nuclear, como: altos níveis de expressão de proteínas, capacidade de expressar múltiplos transgenes em operons e contenção gênica pela ausência de transmissão pelo pólen. Devido ao alto número de cópias do genoma plastidial por cloroplasto e ao alto número de cloroplastos por células vegetais, são necessários ciclos de regeneração sob condições seletivas para obter transformantes homoplásmicos. A análise de homoplasma é realizada pela metodologia de *Southern blot* ou pelo teste de herança do transgene pela germinação de sementes em meio seletivo. O *Southern blot* é trabalhoso, demorado e para maior sensibilidade envolve o uso de radioisótopos, enquanto o teste de germinação é realizado somente após a produção de sementes necessitando de um ciclo de reprodução da planta. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método rápido, sensível e eficaz para determinar o grau de homoplasma de plantas transplastômicas, baseado na técnica de PCR em tempo real. Folhas de fumo foram transformadas com vetores compostos pelos genes $\Delta 9$ *dessaturase* (pMR1), $\Delta 15$ *dessaturase* (pMR3), ω -3 *elongase* (pMR5) e $\Delta 12/\omega 3$ *dessaturase* (pMR10), todos contendo o gene de seleção *aadA*. No total, 44 plantas foram obtidas, sendo 21 plantas positivas para a inserção do transgene. O grau de homoplasma foi determinado pela proporção entre o número de cópias do transgene e o número de cópias do gene endógeno. Inicialmente, misturas de DNA de plantas transplastômicas homoplásmicas (pMR1 e pMR3) com DNA de planta tipo selvagem foram preparadas para simular diferentes graus de homoplasma. DNA da planta transplastômica ou do plasmídeo foi diluído em série para construção das curvas-padrão, com a quantidade dos genes sendo estimada por meio da 'plotagem' nessas curvas. Os índices de homoplasma detectados na PCR em tempo real foram compatíveis com os resultados do teste de germinação com valores abaixo de 1 para plantas heteroplásmicas, 1 para a planta homoplásmica e 0 para as plantas sem a inserção do transgene. Os resultados das análises de amostras coletadas após o primeiro ciclo de regeneração mostraram que 13 das 21 plantas já se apresentavam em estado homoplásmico não sendo necessários mais ciclos de regeneração. A PCR em tempo real mostrou ser um método eficiente para análise do grau de homoplasma de plantas transplastômicas.

Palavras-chave: PCR em tempo real; Transformação de cloroplasto; Análise de homoplasma; Plantas transplastômicas

ABSTRACT

Homoplasmy analysis of tobacco transplastomic plants via real-time PCR

Plastid transformation offers several advantages in relation to nuclear transformation, such as high-level of protein expression, the feasibility of expressing multiple transgenes in operons and gene containment through the lack of pollen transmission. Due to the high copy number of plastidial genome in chloroplasts and the high number of chloroplasts per plant cells, regeneration cycles under selective conditions are necessary to obtain homoplasmic transformants. Homoplasmy analysis is performed by Southern blot methodology or transgene inheritance test through seed germination in selective medium. Southern blot is laborious, time consuming and for more sensitivity it would require the use of radioisotopes, while germination test can be performed only after seed production which require a plant reproduction cycle. The objective of this study was to develop a fast, sensitive and effective method to determine the homoplasmy degree of transplastomic plants, based on real-time PCR. Tobacco leaves were transformed with vectors containing the $\Delta 9$ desaturase (pMR1), $\Delta 15$ desaturase (pMR3), ω -3 elongase (pMR5) and $\Delta 12/\omega 3$ desaturase (pMR10) each one with the *aadA* selection gene. In total, 44 plants were obtained, of which 21 were positive for the insertion of the transgene. The homoplasmy degree was determined by the proportion between the number of transgene copies and the number of endogenous gene copies. Initially, mixtures of homoplastomic plants DNA (pMR1 and pMR3) with wild-type plant DNA were prepared to simulate different degrees of homoplasmy. Transplastomic plant DNA or plasmid DNA was diluted to construct the standard curves and the gene amount was detected by 'plotting' in this curves. The homoplasmy rate detected in real-time PCR were consistent with the results of germination test with values below 1 for heteroplasmic plants, 1 for homoplasmic plants and 0 for plants without the transgene insertion. The results obtained from the samples collected after the first regeneration cycle showed that 13 of the 21 plants were already in a homoplasmic state and did not require more cycles of regeneration. The real-time PCR proved to be an effective method for analyzing the homoplasmy degree of transplastomic plants.

Keywords: Real-time PCR; Chloroplast transformation; Homoplasmy analysis; Transplastomic plants

LISTA DE ABREVIATURAS

^{32}P	Fósforo-32
A	Adenina
<i>aadA</i>	Aminoglicosídeo 3''-adenililtransferase
ALA	Ácido α -linolênico
AMP	Adenosina monofosfato
ANA	Ácido naftalenoacético
ARA	Ácido araquidônico
ATP	Adenosina trifosfato
<i>atpl</i>	Subunidade da ATPase plastidial
BAP	6-benzilaminopurina
<i>bar</i>	Fosfinotricina acetiltransferase
C	Citosina
cm	Centímetro
<i>codA</i>	Citosina deaminase
CTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
cv	Cultivar
DHA	Ácido docosahehexanóico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPA	Ácido eicosapentenóico
<i>EPSPS</i>	5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintase
G	Guanina
<i>gfp</i>	Proteína verde fluorescente
GOI	Gene de interesse
kb	Quilobase (1kb = 1000 pb)
KCl	Cloreto de potássio
LA	Ácido linoléico
<i>lux</i>	Luciferase bacteriana

<i>matK</i>	Maturase
mg	Miligrama
mg/L	Miligrama por litro
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
ng/μL	Nanograma por microlitro
<i>nptII</i>	Neomicina fosfotransferase II
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno glicol
RFLP	Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição
rpm	Rotações por minuto
<i>rps14</i>	Proteína ribossomal 14S
rRNA	RNA ribossômico
RNA	Ácido ribonucléico
T	Timina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
tRNA	RNA transportador
<i>trnfM</i>	tRNA-metionina
<i>trnG</i>	tRNA-glicina
<i>uidA</i>	β-glucuronidase
UTR	Região não traduzida
VLCPUFA	Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia muito longa
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
ω-3/ω-6	Posição da ligação dupla mais próxima ao final metil do ácido graxo

1 INTRODUÇÃO

Os plastídeos são organelas das células vegetais que abrigam um grande número de vias metabólicas e, por essa razão, são conhecidos como o ‘centro biossintético da célula vegetal’ (BOCK, 2007a). É neles que se realizam a fotossíntese e outras funções importantes como sequestro de carbono, produção de amido, evolução de oxigênio, síntese de aminoácidos, ácidos graxos e pigmentos, e aspectos chave do metabolismo de enxofre e do nitrogênio (VERMA; DANIELL, 2007). Tais organelas possuem genoma e maquinaria de transcrição e tradução próprios (MALIGA, 2004).

Desde a realização da transformação genética de cloroplasto há mais de duas décadas atrás (BOYNTON et al., 1988; SVAB; HAJDUKIEWITZ; MALIGA, 1990) essa técnica tem se tornado uma alternativa atrativa em relação a transformação nuclear devido as suas vantagens, entre elas: altos níveis de expressão de proteínas, viabilidade em expressar proteínas múltiplas a partir de mRNAs policistrônicos e contenção gênica pela ausência de transmissão pelo pólen (BOCK, 2007b; KITTIWONGWATTANA et al., 2007; MALIGA, 2004).

Neste contexto, a transformação de cloroplastos tornou-se uma ferramenta valiosa para estudar as funções dos genes plastidiais (HAGER et al., 1999; RUF; KÖSSEL; BOCK, 1997) e seus mecanismos de expressão (ALLISON; MALIGA, 1995; EIBL et al., 1999; KARCHER; KAHLAU; BOCK, 2008), sendo empregada para alterar vias metabólicas nos plastídeos, como a fotossíntese (SHARWOOD et al., 2008; WHITNEY; ANDREWS, 2001, 2003), biossíntese de ácidos graxos (MADOKA et al., 2002), de vitaminas (APEL; BOCK, 2009) e de aminoácidos essenciais (ZHANG et al., 2001).

A manipulação genética de enzimas envolvendo a biossíntese de ácidos graxos é um mecanismo promissor para alterar a composição das sementes e incorporar ácidos graxos de importância nutricional (DAMUDE; KINNEY, 2008; NAPIER, 2007; NAPIER; GRAHAM, 2010; ROGALSKI; CARRER, 2011; WU et al., 2005). Essa tecnologia tem sido usada também para otimizar e aumentar o teor de óleo em plantas destinadas a produção de biodiesel (DURRETT; BENNING; OHLROGGE, 2008; GRAEF et al., 2009; LU et al., 2010).

Devido ao grande número de cópias do genoma plastidial por célula, os transformantes primários normalmente são heteroplásmicos, contendo tanto o genoma selvagem quanto o transplastômico. O estado homoplásmico, em que todas as cópias selvagens são substituídas pelo transgene é geralmente alcançado após alguns ciclos de regeneração. A completa ausência de cópias selvagens é indispensável para se obter um fenótipo interpretável e estável (SWIATEK et al., 2003).

A estratégia geralmente aplicada para monitorar a presença de cópias do tipo selvagem residuais em plantas transplastômicas é a análise por *Southern blot* (DANIELL et al., 2001; De COSA et al., 2001; KUMAR; DHINGRA; DANIELL, 2004a) que é trabalhosa, necessita de uma grande quantidade de amostra vegetal e envolve o uso de radioisótopos (SHEN et al., 2010). Para plantas transplastômicas férteis, a homoplasma pode ser alternativamente examinada pela análise de sementes em ensaios de germinação em larga escala (MALIGA; NIXON, 1998; SVAB; MALIGA, 1993), porém essa análise é realizada somente após um ciclo de reprodução da planta. Visando desenvolver um método rápido, sensível e eficaz para determinar o grau de homoplasma de plantas transplastômicas, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia baseada na técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real. Para isso, foram obtidas plantas transplastômicas com os genes $\Delta 9$ *dessaturase*, $\Delta 15$ *dessaturase*, ω -3 *elongase* e $\Delta 12/\omega 3$ *dessaturase* juntamente com o gene de seleção *aadA* e o grau de homoplasma foi determinado pela proporção entre o número de cópias do transgene e o número de cópias do gene endógeno comparando os resultados à análise de germinação de sementes. Assim, o uso da PCR em tempo real demonstrou ser uma metodologia alternativa que permite reduzir o tempo na análise de identificação das plantas transplastômicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do genoma plastidial

Na célula vegetal, a informação genética está distribuída em três compartimentos celulares: o núcleo, a mitocôndria e o plastídeo. Os dois últimos são derivados de eubactérias primitivas de vida livre, a mitocôndria da α -proteobactéria e o plastídeo da cianobactéria (TIMMIS et al., 2004). Os progenitores procarióticos das organelas celulares atuais foram englobados por uma célula pré-eucariótica em um processo de endossimbiose. Durante a integração gradual dos endossimbiontes adquiridos dentro do metabolismo da célula hospedeira, o genoma das organelas sofreu redução de tamanho devido a perda de genes e sua transferência para o genoma nuclear (MARTIN; HERRMANN, 1998). Plastídeos e mitocôndrias mantiveram características eubacteriais, incluindo a organização dos genes em operons e o mecanismo procariótico de expressão gênica (BOCK, 2001, 2007b; BOCK; KHAN, 2004; MALIGA, 2004; ROGALSKI; CARRER, 2011), além de não obedecerem às regras mendelianas e geralmente exibirem transmissão uniparental para a próxima geração (MALIGA; BOCK, 2011; RUF; KARCHER; BOCK, 2007; SVAB; MALIGA, 2007).

Os genomas das organelas são menores e contém pouca informação genética. O genoma plastidial é uma molécula circular de DNA fita dupla, de 120 a 160 kb de tamanho, geralmente composto de duas regiões repetidas invertidas separando regiões de cópias únicas, contendo aproximadamente 130 genes (SUGIURA, 1989, 1992). A maioria dos genes codificados pelo genoma plastidial são genes relacionados à fotossíntese ou genes do sistema genético (rRNAs, tRNAs, proteínas ribossomais e subunidades da RNA polimerase) (BOCK; KHAN, 2004). Cópias idênticas do genoma plastidial estão presentes em todos os tipos de plastídeos: proplastídeo (não diferenciado predominantemente presente em tecidos meristemáticos), cloroplasto (presente em tecidos fotossinteticamente ativos), plastídeos envolvidos na síntese e armazenamento de diferentes metabólitos tais como amido no amiloplasto, ácido graxo no elaioplasto ou carotenóide no cromoplasto (LOPEZ-JUEZ; PYKE, 2005; PYKE, 2007).

Uma característica notável do genoma plastidial é seu alto nível de ploidia. Uma única célula foliar de fumo contém até 100 cloroplastos, cada um com

aproximadamente 100 cópias idênticas do genoma plastidial, resultando em um grau de ploidia extraordinariamente alto de até 10.000 genomas plastidiais por célula (BENDICH, 1987).

2.2 Transformação genética do genoma plastidial

Os primeiros trabalhos sobre tecnologias para alterar o genoma plastidial da alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (BOYNTON et al., 1988) e da planta superior *Nicotiana tabacum* (SVAB; HAJDUKIEWITZ; MALIGA, 1990) abriram a possibilidade de inserção de genes no genoma plastidial por transformação de cloroplasto.

Vetores para transformação plastidial são plasmídeos derivados de *Escherichia coli* com sequências (1 a 2 kb) do DNA plastidial flanqueando ambos os lados do gene marcador seletivo e dos sítios de clonagem (BOCK, 2001; BOCK; KHAN, 2004; MALIGA, 2004).

A transformação genética estável de plastídeos é obtida após três passos principais. O primeiro é a introdução do vetor por um processo físico. Os métodos utilizados são o tratamento com polietileno glicol (PEG) (GOLDS; MALIGA; KOOP, 1993; O'NEILL et al., 1993), a biolística (SVAB; HAJDUKIEWITZ; MALIGA, 1990) ou a microinjeção (KNOBLAUCH et al., 1999), sendo que esse último método ainda não produziu plantas transplastômicas estáveis. Durante o segundo passo, a integração do DNA ocorre através de dupla recombinação homóloga (BOYNTON et al., 1988; CERUTTI et al., 1992). Qualquer manipulação do genoma plastidial requer que a sequência a ser introduzida (gene marcador e o gene de interesse) seja flanqueada em ambos os lados por regiões de homologia com o genoma do cloroplasto (KAVANAGH et al., 1999; STAUB; MALIGA, 1992). O terceiro passo é a regeneração de plantas transplastômicas, pela forte pressão de seleção, atingindo a homoplasma (BOCK, 2001, 2007b; MALIGA, 2004).

Tentativas de modificar o genoma plastidial de plantas superiores enfrentam dois obstáculos principais: a dificuldade em inserir o gene através da dupla membrana do plastídeo e o enorme número de cópias (poliploidia) do genoma plastidial. Para se obter plantas transformadas geneticamente estáveis, a modificação genética desejada deve estar presente em cada cópia do genoma plastidial em cada célula (homoplasma).

Linhagens celulares transplastômicas primárias contém uma população mista de genoma plastidial selvagem e transformado (heteroplasma) que pode resultar em rápida segregação somática e instabilidade genética. Repetidos ciclos de seleção e regeneração em cultura de tecidos permite a eliminação do genoma selvagem residual que geralmente estão presentes nos transformantes primários. Todas as linhagens transplastômicas obtidas a partir de experimentos de transformação com um dado vetor são, em geral, genética e fenotipicamente idênticas e, em teoria, a produção de uma única planta transplastômica por construção é suficiente (BOCK, 2001; MALIGA, 2004).

Inicialmente, Svab, Hajdukiewicz e Maliga (1990) construíram um vetor de transformação portando um gene modificado do rRNA 16S cloroplastidial para introduzir mutações que conferiam resistência a espectinomicina e estreptomicina. Posteriormente, via vetor de recombinação homóloga, Svab e Maliga (1993) demonstraram uma transformação estável do gene *aadA* (aminoglicosídeo 3"-adenililtransferase) em plastídeos de plantas superiores por biolística seguido por crescimento em meio de seleção com antibiótico. O primeiro marcador de resistência a antibiótico específico para cloroplasto, o gene *aadA*, originalmente identificado em *E. coli*, codifica uma enzima que confere resistência a uma série de antibióticos, incluindo a espectinomicina e a estreptomicina (GOLDSCHMIDT-CLERMONT, 1991; SVAB; MALIGA, 1993). A proteína desse gene catalisa a transferência covalente de um resíduo AMP (adenosina monofosfato) do ATP (adenosina trifosfato) para a espectinomicina, convertendo desse modo o antibiótico em uma forma inativa (adenililespectinomicina) que não inibe a biossíntese de proteínas no ribossomo procariótico 70S presente nos cloroplastos (BOCK, 2001). O antibiótico rotineiramente usado para transformação de cloroplastos é a espectinomicina por causa da sua alta especificidade e baixo efeito colateral nas células vegetais (LI; RUF; BOCK, 2011).

Outros genes marcadores seletivos para transformação plastidial são *nptII* (CARRER et al., 1993; CARRER; MALIGA, 1995), *codA* (SERINO; MALIGA, 1997), *bar* (IAMTHAM; DAY, 2000), *EPSPS* (YE et al., 2001), *gfp* (KHAN; MALIGA, 1999), e *uidA* (STAUB; MALIGA, 1993). Todos os genes marcadores acima têm sido relatados atuando nos plastídeos como um marcador transitório ou marcador visual estável.

Plantas com genoma plastidial transgênico oferecem uma série de vantagens em relação a plantas transgênicas convencionais (geradas por transformação do genoma nuclear), tais como altos níveis de expressão do transgene e acúmulo de proteína >70% do total de proteína celular solúvel, por causa da alta poliploidia do sistema genético plastidial (OEY et al., 2009; RUHLMAN et al., 2010); a possibilidade de expressar múltiplos transgenes em operons devido a eficiente tradução dos mRNAs policistrônicos nos plastídeos (De COSA et al., 2001; KRICHEVSKY et al., 2010; LOESSL et al., 2005; QUESADA-VARGAS; RUIZ; DANIELL, 2005); a ausência de efeito de posição nos plastídeos, pois a integração do transgene ocorre por recombinação homóloga (CERUTTI et al., 1992; STAUB; MALIGA, 1992); ausência de efeitos epigenéticos (silenciamento gênico) (BOCK, 2001) e contenção do transgene devido a herança materna dos cloroplastos na maioria das plantas superiores, isto é, ausência de transmissão dos transgenes pelo pólen (BOCK, 2007b; RUF; KARCHER; BOCK, 2007; SVAB; MALIGA, 2007).

A herança plastidial materna ocorre devido a exclusão do plastídeo por divisão celular desigual na mitose do grão de pólen ou degradação do plastídeo e do DNA plastidial durante o desenvolvimento do gametófito masculino (BOCK, 2007b; HAGEMANN, 1992). Consequentemente, a célula espermática que fertiliza o óvulo está livre de plastídeos e DNA plastidial, portanto o zigoto recebe seus plastídeos exclusivamente do óvulo sem contribuição do pólen (BOCK, 2001, 2007b).

Essa ausência de transmissão dos transgenes plastidiais pelo pólen envolve as duas principais preocupações sobre plantas transgênicas: a probabilidade de espalhar o transgene sem controle via pólen dos campos de cultura transgênica para campos de cultura não transgênica, e a possibilidade de cruzamentos pela transmissão do transgene a partir de culturas transgênicas para plantas selvagens (BOCK, 2007b; DANIELL, 2007; RUF; KARCHER; BOCK, 2007; SVAB; MALIGA, 2007).

Vários antígenos contra bactérias (DANIELL et al., 2001; KOYA et al., 2005; TREGONING et al., 2003), vírus (BIRCH-MACHIN et al., 2004; MOLINA et al., 2004), protozoários (CHEBOLU; DANIELL, 2007) e proteínas terapêuticas humanas (FERNANDEZ-SAN et al., 2003; LEELAVANTHI; REDDY, 2003; RUHLMAN et al., 2007; STAUB et al., 2000) têm sido desenvolvidos em cloroplastos de fumo

transgênico. Níveis elevados de expressão, em adição a contenção do transgene, faz este conceito comercialmente atraente. As plantas têm um potencial considerável para a produção de produtos farmacêuticos, vacinas e anticorpos, uma vez que elas proporcionam uma fonte barata de proteína e metabólitos secundários (GIDDINGS et al., 2000). Staub et al. (2000) expressaram o hormônio do crescimento humano (somatotropina) no genoma plastidial de fumo e houve aumento de 7% no total de proteínas solúveis. Recentemente, uma proteína bactericida derivada de fago também foi expressa no genoma plastidial de fumo com acúmulo >70% do total de proteínas solúveis da planta (OEY et al., 2009).

Várias características têm sido introduzidas por meio do genoma plastidial, incluindo resistência a insetos (DE COSA et al., 2001; McBRIDE et al., 1995), a herbicidas (HAGEMANN, 2004), a doenças causadas por bactérias e fungos (DeGRAY et al., 2001), tolerância a seca (LEE et al., 2003), ao sal (KUMAR; DHINGRA; DANIELL, 2004a), fitorremediação (RUIZ; DANIELL, 2009; RUIZ et al., 2003, 2011), alteração metabólica (APEL; BOCK, 2009; KRICHEVSKY et al., 2010; WURBS; RUF; BOCK, 2007) e enzimas para produção de biocombustíveis (GRAY; AHNER; HANSON, 2009; VERMA et al., 2010).

Além do fumo (SVAB; HAJDUKIEWITZ; MALIGA, 1990), o genoma plastidial de outras culturas foi transformado, incluindo batata (VALKOV et al., 2010), tomate (RUF et al., 2001), *Lesquerella fendleri* (SKARJINSKAIA; SVAB; MALIGA, 2003), algodão (KUMAR; DHINGRA; DANIELL, 2004b), cenoura (KUMAR; DHINGRA; DANIELL, 2004a), petúnia (ZUBKOT et al., 2004), couve-flor (NUGENT et al. 2006), álamo (OKUMURA et al., 2006), alface (KANAMOTO et al., 2006), repolho (LIU et al., 2007), soja (DUFOURMANTEL et al., 2004) e beterraba (MARCHIS et al., 2009).

Embora a transformação de cloroplasto seja muito atrativa, essa tecnologia não é amplamente usada como a transformação nuclear e tem sido usada em poucas espécies vegetais, principalmente em fumo (CRAIG et al., 2008; SCOTTI et al., 2009; SORIA-GUERRA et al., 2009). O principal obstáculo para se estender a tecnologia para outras espécies e, principalmente, para as principais culturas é imposto por limitações nos sistemas de cultura de tecidos disponíveis e nos protocolos de regeneração para plantas transplastômicas (RUF et al., 2001). Tecidos vegetais regeneram *in vitro* através

de duas vias, a 'organogênese', onde brotos são organizados pela atividade meristemática das células e a 'embriogênese', onde geralmente uma célula ou um pequeno grupo delas se diferenciam para produzir embriões somáticos similares aos embriões zigóticos (CHANDRA; PENTAL, 2003). A principal barreira para sua efetivação também pode estar no baixo nível de expressão do gene plastidial em células totipotentes não verdes como em algumas espécies propagadas *in vitro* (DUFOURMANTEL et al., 2004).

A transformação do genoma plastidial é empregada para investigar a função dos seus genes criando plantas *knockout*, gerando novas vias metabólicas para a produção de pigmentos de interesse (HASUNUMA et al., 2008) ou alterando as vias metabólicas existentes como, a fotossíntese (SHARWOOD et al., 2008; WHITNEY; ANDREWS, 2001, 2003), a biossíntese de lipídios (MADOKA et al., 2002), de vitaminas (APEL; BOCK, 2009) e de aminoácidos essenciais (ZHANG et al., 2001). Apel e Bock (2009) produziram plantas de tomate transgênicas com um aumento de até 50% no conteúdo de provitamina A (uma importante vitamina antioxidante e essencial para nutrição humana) nos frutos. Recentemente, a expressão do operon *lux* contendo seis genes nos plastídeos, produziu plantas capazes de emitir luz de forma autônoma e visível a olho nu (KRICHEVSKY et al., 2010), demonstrando que complexas vias metabólicas podem ser reconstruídas em plastídeos de plantas superiores.

Após a geração das plantas transgênicas, a eliminação do gene de resistência ao antibiótico se faz necessária para prevenir o risco do fluxo desses genes (preocupação pública) e para reciclá-los já que são relativamente restritos (BARONE; ZHANG; WIDHOLM, 2009; CARRER et al., 1993; CORNEILLE et al., 2001; LI; RUF; BOCK, 2011; SVAB; MALIGA, 1993). O primeiro trabalho descrevendo a remoção do gene de resistência ao antibiótico foi baseado na excisão do marcador por recombinação '*loop-out*', que ocorre pela presença de pequenas repetições em ambos os lados do gene marcador (IAMTHAM; DAY, 2000). O problema desse método é que a transformação do genoma plastidial e a remoção do marcador podem ocorrer simultaneamente. Portanto, se o gene de seleção for excisado antes que todos os genes plastidiais selvagens sejam eliminados não haverá como alcançar a homoplasma.

Outro mecanismo para a remoção do marcador usa o sistema CRE/lox (CORNEILLE et al., 2001; HAJDUKIEWICZ; GILBERTSON; STAUB, 2001). O gene marcador (flanqueado por dois sítios *lox*) e o gene de interesse são introduzidos no genoma plastidial. Quando a eliminação do gene marcador é requerida, o gene *CRE* é introduzido no núcleo e, após ser importado nos plastídeos, excisa a sequência entre os sítios *lox*. O gene *CRE* pode ser introduzido por uma transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (CORNEILLE et al., 2001; HAJDUKIEWICZ; GILBERTSON; STAUB, 2001) ou por polinização (CORNEILLE et al., 2001). Esse gene nuclear é subsequentemente removido pela segregação da progênie.

Alterar características economicamente importantes em plantas cultivadas tem sido o principal objetivo da pesquisa biotecnológica. A alteração metabólica provavelmente contribuirá para um aumento na produtividade agrícola garantindo alimentos mais nutritivos e, além disso, fornecendo uma plataforma de baixo custo para a produção de compostos farmacêuticos e nutracêuticos (CLARKE; DANIELL, 2011; MALIGA; BOCK, 2011; ROGALSKI; CARRER, 2011).

2.3 Alteração na via biossintética dos ácidos graxos em plantas

Os ácidos graxos são algumas das macromoléculas mais importantes em todos os organismos vivos, não apenas como componentes essenciais das membranas celulares e das moléculas de sinalização celular, mas também como as principais reservas energéticas em tecidos de armazenamento, como as sementes (MU et al., 2008). A via biossintética dos ácidos graxos é uma via metabólica primária encontrada em todas as células da planta, sendo essencial para seu crescimento (OHLROGGE; BROWSEB, 1995).

Esses ácidos graxos têm grande importância na dieta humana e são derivados de culturas oleaginosas, principalmente de soja, canola, palma e girassol (GUNSTONE, 2001). Os ácidos graxos mais abundantes produzidos nas principais oleaginosas compreendem somente quatro tipos (ácido linoléico, ácido palmítico, ácido láurico e ácido oléico), faltando-lhes completamente os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia muito longa (VLCPUFA – *Very Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids*) (LANDS, 2005). Os mamíferos têm uma exigência na dieta por dois ácidos graxos essenciais: o

ácido linoléico ω -6 (LA) e ácido α -linolênico ω -3 (ALA). No entanto, a produção de LA e ALA é dependente da espécie vegetal e varia dentro das diferentes culturas oleaginosas (GUNSTONE et al., 2006).

Os VLCPUFAs contêm pelo menos 20 carbonos que são produzidos através de uma série de reações de dessaturação e alongamento, onde LA é metabolizado a ácido araquidônico (ARA) e ALA é metabolizado a ácido eicosapentenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) (SAYANOVA; NAPIER, 2004).

Na dieta, a razão recomendada dos ácidos graxos ω -6/ ω -3 varia de 2:1 a 6:1 (SARGENT, 1997; SIMOPOULOS, 2000), mas estima-se que o consumo dos ácidos graxos ω -6 está 30 vezes maior que o recomendado (SIMOPOULOS, 1999) devido ao aumento no consumo de óleos vegetais ricos em LA. Como esses ácidos graxos não são convertidos entre si no corpo humano, a razão de LA/ALA na dieta influencia a síntese de VLCPUFA ω -6/ ω -3 (ROGALSKI; CARRER, 2011).

No corpo humano, a conversão de LA e ALA para VLCPUFA é relativamente ineficiente, devendo ser obtidos pela dieta, principalmente pelo consumo de peixe e óleo de peixe (SMITH, 2005; SPRECHER, 2000). Mas, uma crescente demanda por peixes e seus óleos com alto teor de VLCPUFA ω -3 está aumentando o desgaste sobre um recurso superexplorado (PAULY et al., 2002). Além disso, a remoção de odores e sabores desagradáveis, bem como contaminantes aumenta os custos limitando o uso do óleo de peixe como ingrediente alimentar (HITES et al., 2004; JACOBS et al., 2004).

Recentemente, alternativas biotecnológicas têm focado na alteração genética das plantas oleaginosas para incorporar ácidos graxos com importância nutricional (DAMUDE; KINNEY, 2008; NAPIER, 2007; NAPIER; GRAHAM, 2010; WU et al., 2005) que não são obtidos a partir das culturas domesticadas (CAHOON et al., 2007; NAPIER, 2007; SINGH et al., 2005).

Qi et al. (2004) foram os primeiros a demonstrar a produção de VLCPUFA com 20 carbonos (~7% de ARA e 3% de EPA), expressando constitutivamente uma elongase e duas dessaturases em *Arabidopsis thaliana* transgênica. Wu et al. (2005) demonstraram a viabilidade em produzir VLCPUFAs em *Brassica juncea* transgênica, otimizando, primeiramente, o acúmulo de ácidos graxos ω -3 (EPA ao invés de ARA)

para depois convertê-los a DHA, resultando no acúmulo de ARA (4%), EPA (8%) e DHA (0,2%).

Em relação à alteração das vias metabólicas dos ácidos graxos nos plastídeos, Madoka et al. (2002) superexpressaram o gene *accD* (codifica a β -subunidade da acetil-CoA carboxilase) alterando seu promotor natural por um promotor constitutivo forte e produziram plantas com aumento no teor de ácidos graxos nas folhas, atraso na senescência foliar e aumento na produção de sementes. Craig et al. (2008) produziram plantas transplastômicas de fumo expressando o gene *$\Delta 9$ dessaturase* que apresentou um aumento no grau de insaturação dos ácidos graxos nas folhas e sementes.

Recursos alternativos para produção de VLCPUFAs são, portanto, desejáveis, e a possibilidade de obtê-los a partir de plantas superiores em quantidades comerciais e sustentáveis é particularmente atrativa. No entanto, nenhuma espécie oleaginosa produz tais substâncias naturalmente, havendo a necessidade de alterar geneticamente a capacidade de sintetizar esses ácidos graxos em tais espécies (QI et al., 2004).

2.4 Análise de homoplasmia de plantas transplastômicas

De acordo com os protocolos comumente utilizados para transformação plastidial, folhas de fumo são bombardeadas com partículas de ouro cobertas por DNA, cortadas em pequenos pedaços e transferidas a um meio de regeneração com antibiótico. O meio seletivo impede a regeneração de células do tipo selvagem e os indivíduos transplastômicos são identificados por brotos verdes. Esses brotos regenerados a partir de folhas bombardeadas são quiméricos. Plantas geneticamente estáveis com uma população uniforme de DNA plastidial transformados são obtidas pela regeneração de novos brotos a partir de folhas quiméricas (TUNGSUCHAT-HUANG et al., 2011).

Estimar o número de cópias do transgene no sistema de transformação de cloroplasto é importante para obter plantas transplastômicas estáveis. Como dito anteriormente, o estado em que todas as cópias do genoma plastidial são idênticas ao transgene é definido como estado homoplásmico (GUDA; LEE; DANIELL, 2000; SVAB; MALIGA, 1993). Quando linhagens transgênicas heteroplásmicas são cultivadas sem a pressão de seleção dos antibióticos, o gene inserido pode ser perdido do genoma

transplastômico. Isso quer dizer que plantas transplastômicas estáveis não serão obtidas até que as plantas sejam totalmente homoplásmicas. As plantas transplastômicas podem se tornar homoplásmicas na geração T0 ou após mais ciclos de seleção (BOCK, 2001; LI et al., 2006; MALIGA, 2004; ROGALSKI; CARRER, 2011; SORIA-GUERRA et al., 2009).

Se o gene afetado cumpre uma tarefa vital, após a transformação a planta permanece heteroplásmica com cromossomos plastidiais selvagens e transformados coexistindo a uma taxa relativamente constante sob condições seletivas para a expressão do transgene (DRESCHER et al., 2000; ROGALSKI; RUF; BOCK, 2006; ROGALSKI et al., 2008). Portanto, para julgar se um gene plastidial é dispensável ou não, é essencial provar que os mutantes *knockouts* transplastômicos atingem o estado homoplásmico (gene dispensável) ou permanecem em estado heteroplásmico (gene essencial) (SWIATEK et al., 2003).

Existem algumas técnicas para detectar o grau de homoplasma de plantas transplastômicas. Uma é a PCR convencional com dois *primers* que estão localizados no genoma do cloroplasto (KANAMOTO et al., 2006). Este método somente é aplicável quando o gene inserido for pequeno. No desenvolvimento de transgênicos de cloroplasto com transgene maior, a PCR convencional não consegue detectar a homoplasma, sendo a técnica de *Southern blot* (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) amplamente utilizada nesta análise (DANIELL et al., 2001; DE COSA et al., 2001; KUMAR; DHINGRA; DANIELL, 2004a). No entanto, este método é trabalhoso, demorado, exige uma quantidade considerável de amostra de DNA, frequentemente envolve o risco do uso de radioisótopos (MASON et al., 2002) e, além disso, pode não dar o grau preciso da homoplasma. A análise da condição heteroplásmica pode ser também investigada pela técnica de *Southern blot* realizada em DNA extraído de cloroplastos purificados ao invés do DNA celular total (MALIGA; NIXON, 1998).

Um teste inequívoco para a transformação plastidial é a análise das sementes em ensaio de germinação em larga escala (BOCK, 2001; MALIGA, 2004; MALIGA; NIXON, 1998; SVAB; MALIGA, 1993). Plantas transgênicas geram plântulas uniformemente verdes em meio seletivo somente se elas forem homoplásmicas. Caso as plantas estejam em estado heteroplásmico, algumas de suas sementes conterão

cópias do tipo selvagem com ausência do gene marcador seletivo (MALIGA; NIXON, 1998), produzindo plântulas variegadas ou totalmente brancas em meio contendo antibiótico.

A PCR em tempo real é uma tecnologia em rápido desenvolvimento, muito sensível para a detecção do número de cópias do gene exógeno em plantas transgênicas (DING et al., 2004; YANG et al., 2005a, 2005b). Recentemente, Shen et al. (2010) utilizaram essa técnica para análise de homoplasma, mas mostraram seu potencial baseando-se, principalmente, em análises de DNA plasmidial, sendo que poucas amostras de DNA genômico foram utilizadas. Neste trabalho, uma nova estratégia baseada na técnica de PCR em tempo real foi desenvolvida para avaliar o grau de homoplasma de plantas transplastômicas de fumo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas do Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), do Departamento de Ciências Biológicas, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo.

3.1 Material vegetal

Sementes de fumo (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana) foram esterilizadas em etanol 70% por 2 minutos e hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 3 minutos, sendo posteriormente lavadas 5 vezes com água deionizada autoclavada, em câmara de fluxo laminar. As sementes estéreis foram inoculadas em meio basal MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, com intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas. Folhas consideradas completamente desenvolvidas foram utilizadas para os experimentos de transformação genética por biolística.

Plantas transplastômicas foram enraizadas no mesmo meio de cultura com adição de 500 mg/L de espectinomicina, após autoclavagem (SVAB; MALIGA, 1993).

O crescimento das plantas para a produção de sementes ocorreu em casa de vegetação. As plantas foram aclimatizadas em vasos com substrato sob 16 horas de fotoperíodo a 25 ± 2 °C.

3.2 Vetores de transformação

Os plasmídeos utilizados para transformação plastidial de fumo foram construídos pelo Dr. Marcelo Rogalski em seu trabalho de pós-doutorado.

O vetor de transformação pRB96 (Figura 1) (WURBS; RUF; BOCK, 2007) foi utilizado como vetor básico de clonagem para os genes de interesse (dessaturases e elongase) de acordo com a Tabela 1. O vetor pRB96 é composto pelo cassete que compreende o gene *aadA* que confere resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomicina sob regulação do promotor do operon ribossômico 16S plastidial de fumo (*Prrn*) e terminador do gene plastidial de fumo *psbA* (*TpsbA*), o qual codifica uma

subunidade do fotossistema II. Este vetor também inclui um cassete para expressão do gene de interesse (GOI), sob regulação do promotor e 5'UTR (*untranslated region*) do gene plastidial *atpI* (*PatpI*), que codifica uma subunidade da ATPase plastidial e da região 3'UTR do gene plastidial de fumo *rps16* (*Trps16*) que codifica para a proteína 16S da subunidade ribossomal pequena.

Tabela 1 – Vetores de transformação com seu respectivo gene, espécie de origem, número de acesso no banco de dados e referência

Plasmídeo	Produto gênico	Espécie	Número de acesso	Referência
pMR1	$\Delta 9$ dessaturase	<i>Synechocystis sp</i> (cianobactéria)	sll0541	SAKAMOTO et al., 1994a
pMR3	$\Delta 15$ dessaturase	<i>Synechocystis sp</i> (cianobactéria)	sll1441	SAKAMOTO et al., 1994b
pMR5	ω -3 elongase	<i>Danio rerio</i> (peixe zebra)	AF32782	HASTINGS et al., 2001
pMR10	$\Delta 12/\omega 3$ dessaturase	<i>Fusarium moniliforme</i> (fungo)	DQ272516	DAMUDE et al., 2006

Figura 1 – Mapas do genoma plastidial e do vetor de transformação. (A) Mapa da região alvo do genoma plastidial; (B) Vetor para clonagem do gene de interesse (GOI) e do gene *aadA*, com seus respectivos promotores e terminadores

3.3 Transformação do genoma plastidial e seleção de plantas transplastômicas

Folhas jovens completamente desenvolvidas de fumo foram bombardeadas com partículas de ouro (0,6 μ m) cobertas com o DNA plasmidial utilizando o bombardeador

de partículas PDS1000He (Bio-Rad). Após o bombardeamento, as folhas foram cortadas (5 x 5 mm) e inoculadas em meio de seleção com antibiótico [meio MS, 1,0 mg/L de 6-benzilaminopurina (BAP), 0,1 mg/L de ácido naftalenoacético (ANA) e 500 mg/L de espectinomicina], onde permaneceram até a emissão de brotações.

Para enriquecer o genoma transplastômico e selecionar para a homoplasma, os brotos resistentes ao antibiótico espectinomicina tiveram uma folha cortada em pequenos pedaços os quais foram inoculados no mesmo meio de seleção e o broto foi transferido para meio MS sem antibiótico. Várias linhagens transplastômicas independentes foram submetidas a quatro ciclos de regeneração em meio de seleção. Após o primeiro ciclo de regeneração, folhas de todas as amostras foram coletadas e armazenadas a -80 °C para extração de DNA e análise de homoplasma via PCR em tempo real.

3.4 Extração de DNA

O DNA das amostras foi extraído de acordo com método de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990).

Aproximadamente 200 mg de tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para microtubos, onde foram acrescentados 800 µL de tampão de extração CTAB (1,4 M de NaCl; 100 mM de Tris-Cl pH 8.0; 20 mM de EDTA; 2,0% de CTAB) e 8,0 µL de β-mercaptoetanol. O microtubo foi agitado e incubado em banho seco a 60 °C por 30 minutos (com agitação a cada 10 minutos). Após resfriamento, foram acrescentados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguido de agitação por 10 segundos e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos.

O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, sendo acrescentado novamente o clorofórmio:álcool isoamílico, agitado e centrifugado por 10 minutos. Após nova transferência do sobrenadante, foi acrescentado isopropanol (70% do volume de sobrenadante). As amostras foram invertidas e centrifugadas por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% com centrifugação de 10 minutos a 12.000 rpm.

Após descarte do etanol, o precipitado foi secado na temperatura ambiente, ressuspendido em 20 µL de água mili-Q autoclavada e armazenado a -20 °C.

3.5 Análise da presença do transgene por PCR

Os *primers* do gene *aadA* (senso: 5'-GGT GAT CTC GCC TTT CAC GTA G-3'; anti-senso: 5'-GCA GTG GAT GGC GGC CTG AAG-3') foram utilizados para avaliar se houve a integração do transgene nas plantas transformadas com o vetor pMR10 que cresceram em meio seletivo e para detectar a presença de escapes, ou seja, plantas sem o gene de interesse que tiveram mutação espontânea do gene rRNA 16S e adquiriram resistência a espectinomicina (BOCK; KHAN, 2004; SVAB; MALIGA, 1993). A amplificação dos fragmentos foi realizada em termociclador (Applied Biosystems) num volume de PCR total de 25 µL por reação contendo 2,5 µL de tampão KCl, 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,6 µL de dNTP, 1,0 µL de cada primer, 100 ng de amostra de DNA e 0,3 µL de Taq DNA Polimerase (Fermentas). O protocolo de amplificação incluiu uma desnaturação inicial a 96 °C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 96 °C por 30 segundos para desnaturação, 60 °C por 30 segundos para anelamento, 72 °C por 1 minuto para extensão, e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

As plantas transformadas com o gene *aadA* foram analisadas com os *primers* do gene *Δ12/ω3 dessaturase* (senso: 5'-TTT TCC CGG GGC GGA CAG CGA ACT GC-3'; anti-senso: 5'-TTT TTC TAG ACT ACA TCG CAT GGC AC-3') para confirmar a inserção do transgene. A amplificação foi realizada com uma desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 40 segundos, 72 °C por 1 minuto e 10 segundos, e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Outra análise de PCR foi realizada para verificar se ocorreu a integração sítio-específica do transgene no genoma plastidial. Dois pares de *primers* foram utilizados: o *primer* 5HS (5'-ATT CCC GCT ATC CGC CCA AGA TCC AAG AT-3'), que se anela na região do gene flaqueador *trnG*, com o *primer* senso do gene *aadA*; e o *primer* 3HS (5'-TTA GTT TTC AGT TCT TAT CTT CGG CGC GGG GTA-3'), localizado no outro gene flaqueador (*trnfM*), em conjunto com o *primer* anti-senso do gene de seleção. O protocolo de amplificação consistiu de uma desnaturação a 94 °C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minutos e 10 segundos para o primeiro par de *primers* e 3 minutos para o segundo par, e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Para o segundo par de *primers* foi utilizada

a Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM) devido ao tamanho do fragmento a ser amplificado.

3.6 Teste de germinação

Para o teste de germinação, que determina a herança do transgene no genoma plastidial, sementes coletadas a partir de regenerantes primários e de plantas provenientes de subcultivos em meio seletivo foram desinfestadas de acordo com o protocolo descrito anteriormente (Item 3.1) e inoculadas em meio de cultura MS basal (plantas tipo selvagem) e em meio MS com antibiótico (plantas tipo selvagem e transplastômicas) (ROGALSKI; RUF; BOCK, 2006).

3.7 Teste de homoplasma por PCR

Para verificar a possibilidade de avaliar o estado de homoplasma de plantas transplastômicas por PCR, foram utilizadas amostras de DNA de plantas homoplásmicas confirmadas pelo teste de germinação de sementes. A amplificação foi realizada com os *primers* 5HS e 3HS que anelam nos genes flancueadores (*trnfM* e *trnG*) do cassete inserido. Por ser um fragmento grande, houve duas modificações em relação à reação de PCR realizada no Item 3.5. A Taq DNA Polimerase foi trocada pela Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e foi utilizado 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM).

A reação de PCR para detecção do transgene foi realizada com um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 45 segundos, 72 °C por 3 minutos, e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C.

3.8 Teste de homoplasma por PCR em tempo real

Nas plantas transplastômicas, o grau de homoplasma foi determinado pela proporção entre o número de cópias do transgene e o número de cópias dos genes endógenos em cloroplastos transformados e selvagens, isto é, pelo cálculo do número de cópias do gene *aadA* em relação aos genes endógenos *rps14*, *matK* e *atpI*. O número de cópias dos genes foi quantificado pelo método de PCR

quantitativa em tempo real. Diferentemente da PCR semi-quantitativa, onde apenas o produto final da amplificação pode ser visualizado, a técnica de PCR em tempo real permite a quantificação relativa do material genético por meio da análise dos níveis de fluorescência emitidos por fluorocromos específicos em cada ciclo de amplificação.

Para simular diferentes graus de homoplasma, foram criadas séries de misturas de DNA de plantas transplastômicas homoplásmicas transformadas com os plasmídeos pMR1 e pMR3 (descritos na Tabela 1) com DNA de plantas tipo selvagem (a porcentagem de DNA de planta transplastômica e planta tipo selvagem em cada amostra foi, respectivamente, 100/0 – 90/10 – 80/20 – 70/30 – 60/40 – 50/50 – 40/60 – 30/70 – 20/80 – 10/90 – 0/100). Para quantificar o número de cópias absolutas dos genes, plantas transplastômicas e plasmídeos foram usados como calibradores, sendo diluídos em série (1:10) para construção das curvas-padrão. A quantidade do transgene nas amostras foi estimada pelo método *Quantification – Relative Standard Curve*, onde o número de cópias de cada gene em cada amostra é acessado por meio da ‘plotagem’ dos resultados da PCR nas curvas-padrão.

As curvas desenhadas com os plasmídeos foram iniciadas na concentração de 0,2 ng/μL de DNA no primeiro ponto e diluídas sequencialmente até a concentração de 1:10⁵ no quinto ponto. As curvas desenhadas com as plantas foram construídas da mesma maneira, com uma quantidade inicial de 20 ng/μL de DNA. A eficiência dos *primers* foi calculada pela equação:

$$E = [10^{(1/-s)}] - 1 \quad (1)$$

onde s é a inclinação da reta (GINZINGER, 2002).

A inserção dos genes nas regiões do genoma plastidial de cópia única determina uma taxa de 1:1 para um gene nativo nessas mesmas regiões. O nível de homoplasma foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{Grau de homoplasma} = \frac{\text{número de cópias do transgene}}{\text{número de cópias do gene endógeno}} \quad (2)$$

Para as análises de homoplasma através de PCR em tempo real foram utilizados os *primers* descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – *Primers* para PCR em tempo real

Nome	Orientação	Sequência (5' - 3')
<i>rps14</i>	Senso	AGG TTC CGT CGT TGA GTG AC
	Anti-senso	GTC GAT GAA GGC GTG TAG GT
<i>atpI</i>	Senso	GGC ATA TTT CTA TGC GGG TCT
	Anti-senso	GGT AAA AGG ATT GGG GTT GG
<i>matK</i>	Senso	AAT GCG AAT CCA CTT TCG TC
	Anti-senso	TCA AGA AGG GCT CCA AAA GA
<i>aadA</i>	Senso	TGA TTT GCT GGT TAC GGT GA
	Anti-senso	AGC CGA AGT TTC CAA AAG GT
<i>slI0541</i> ($\Delta 9$ des)	Senso	TGT ATT TCC CAC CGC AGT TT
	Anti-senso	GGC TAG GGT GCC ACA GAT TA
<i>slI1441</i> ($\Delta 15$ des)	Senso	TGG TAT CGT GGT GAT GAC TG
	Anti-senso	GGG GTT ATG AAG CCG TAA T

A PCR em tempo real foi realizada em termociclador fluorométrico (StepOne Plus Real-Time PCR System - Applied Biosystems) e os dados foram analisados no StepOne™ Software v2.1 (Applied Biosystems). Cada reação continha 12,5 µL de mix (Platinum® SYBR® Green Reagents – Invitrogen), 0,3 µL de cada *primer*, 6,9 µL de água mili-Q autoclavada e 5,0 µL de DNA. As amplificações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram coletados durante a etapa de alongamento de cada ciclo. Cada reação foi realizada com três replicatas.

4 RESULTADOS

4.1 Transformação do genoma plastidial e seleção de plantas transplastômicas por PCR

O processo de transformação do genoma do cloroplasto foi realizado pelo bombardeamento de folhas jovens de fumo com os vetores de transformação pMR1, pMR3, pMR5 e pMR10 (Tabela 1), de acordo com Svab e Maliga (1993). As folhas bombardeadas foram cortadas em pequenos pedaços e mantidas em meio de regeneração com agente seletivo. Após um período de no mínimo 30 dias, surgiram as primeiras prováveis plantas transplastômicas.

As plantas transplastômicas para as construções pMR1, pMR3 e pMR5 foram analisadas pelo pós-doutorando Marcelo Rogalski que identificou as plantas transplastômicas e as cedeu para o desenvolvimento deste trabalho.

Plantas transgênicas transformadas com o plasmídeo pMR10 foram obtidas. Do total de 44 plantas, metade regenerou como broto e metade como calo (Figura 2). Os brotos resistentes tiveram uma folha cortada em pequenos pedaços que foram transferidos para o mesmo meio de seleção para aumentar o número de cópias do genoma plastidial contendo o transgene, enquanto o broto foi transferido para meio MS sem antibiótico, por considerar que, em geral, os brotos primários são heteroplásmicos, sendo mantidos para as análises de homoplasma.

Figura 2 – Regeneração de broto (seta maior) e calo (seta menor) de fumos transplastômicos em meio de seleção com espectinomicina. Barra: 1 cm

Todas as linhagens transplastômicas passaram por quatro ciclos de regeneração em meio de seleção, sendo que amostras de folhas foram coletadas após o primeiro ciclo de regeneração para análise do grau de homoplasma por PCR em tempo real.

A análise da PCR com os *primers* do gene *aadA* identificou 21 plantas positivas para o gene. O *amplicon* esperado de 0,6 kb foi detectado nas plantas transplastômicas e nenhum fragmento similar foi detectado nas amostras de DNA de plantas tipo selvagem. As demais plantas que cresceram no meio seletivo sem apresentarem a inserção do gene *aadA* adquiriram resistência espontânea a espectinomicina provavelmente através de mutações no gene rRNA 16S do cloroplasto (SVAB; HAJDUKIEWICZ; MALIGA, 1990).

Para confirmar a integração, as plantas transplastômicas para o gene *aadA* também foram analisadas quanto a inserção do transgene $\Delta 12/\omega 3$ *dessaturase* e todas as 21 plantas apresentaram o *amplicon* esperado de 1,2 kb.

A inserção sítio-específica do transgene no genoma plastidial foi confirmada por PCR. Os *amplicons* de 1,1 kb (Figura 3A) e 2,7 kb (Figura 3B) foram detectados em todas as plantas transplastômicas. O resultado mostrou que o cassete foi corretamente integrado no sítio específico por recombinação homóloga na região intergênica dos genes *trnFM* e *trnG*.

Figura 3 – Análise de PCR de fumo transplastômico transformados com o vetor pMR10. (A) Resultado da PCR com *primers* 5HS e *aadA* (senso); (B) Resultado da PCR com *primers* 3HS e *aadA* (anti-senso). 1 – 1 kb *Ladder Plus*; 2 – Controle negativo (H₂O); 3 – Vetor de transformação; 4 – Planta tipo selvagem; 5 a 9 – Plantas transplastômicas

4.2 Teste de germinação

Todas as 22 plantas provenientes de brotações foram transferidas e cresceram em meio sem antibiótico. As plantas foram aclimatizadas e suas sementes foram

usadas para o teste de germinação em meio de cultura MS contendo espectinomicina (500 mg/L). Dentre essas plantas, 8 apresentavam-se completamente verdes, mas foram excluídas por apresentarem PCR negativo para o gene *aadA*.

Os resultados do teste de germinação de sementes provenientes das demais plantas mostraram que 8 plantas eram homoplásmica para o genoma selvagem com as sementes germinadas completamente brancas, 4 eram homoplásmica para o cloroplasto transgênico, onde as plântulas eram completamente verdes, e 2 plantas germinaram apresentando o fenótipo verdes e brancas, o que indica um grau de heteroplasma (Figura 4).

Figura 4 - Teste de herança do transgene através da germinação de sementes em meio de cultura com espectinomicina. (A) Sementes homoplásmicas para o genoma selvagem; (B) Sementes homoplásmicas para o transgene; (C) Sementes heteroplásmicas. Barras: 0,5 cm

As plantas que produziram plântulas brancas após germinação sugerem que houve perda do transgene quando os brotos foram transferidos para o meio sem antibiótico, produzindo sementes homoplásmicas para o genoma selvagem. Estas sementes não contêm o gene de resistência ao antibiótico, bloqueando a síntese de proteínas no cloroplasto e inibindo a síntese de clorofila, determinando assim a coloração branca.

As plântulas verdes possuíam o gene de resistência ao antibiótico, sendo homoplásmicas para o genoma transplastômico. Já as plantas com germinação verde e branca eram heteroplásmicas, possuindo tanto o gene tipo selvagem quanto o gene *aadA*. Essas plantas foram analisadas pela técnica de PCR em tempo real para avaliar o grau de homoplasma.

4.3 Teste de homoplasma por PCR

Plantas transplastômicas homoplásmicas (pMR1 e pMR10) confirmadas pelo teste de germinação de sementes foram utilizadas para verificar a possibilidade de analisar o estado de homoplasma pela técnica de PCR.

As amplificações foram realizadas com os *primers* 5HS e 3HS (Figura 5). As plantas transplastômicas apresentaram dois fragmentos amplificados, um fragmento maior com *amplicon* de 2,8 kb para planta transformada com vetor pMR1 e 3,0 kb para a planta transformada com vetor pMR10 e um fragmento menor com 0,3 kb para ambas as plantas e também para a planta selvagem. Certamente, os fragmentos menores das plantas transplastômicas são derivados da amplificação do genoma plastidial integrado no nuclear (AYLIFFE; TIMMIS, 1992). Portanto, essa PCR não se mostrou adequada para avaliar o estado de homoplasma de plantas transplastômicas.

Figura 5 – Análise de homoplasma de plantas transplastômicas de fumo por PCR com *primers* 5HS e 3HS. 1 – 1 kb *Ladder Plus*; 2 – Controle negativo (H₂O); 3 – Planta tipo selvagem; 4 – Planta transformada com vetor pMR1; 5 – Planta transformada com vetor pMR10

4.4 Análise do grau de homoplasma via PCR em tempo real

Para determinar o potencial da técnica de PCR em tempo real para avaliar o grau de homoplasma foram criadas séries de misturas de DNA de uma planta tipo selvagem com o DNA de uma planta transplastômica previamente confirmada pelo teste de germinação, com o objetivo de simular diferentes níveis de heteroplasma (Tabela 3 e 4), desde 100% de DNA proveniente de planta transplastômica até 100% de DNA de planta tipo selvagem. Na Tabela 3 está demonstrado os resultados da PCR em tempo real para uma planta homoplásmica obtida da transformação com o vetor pMR1 (Tabela

1) e na Tabela 4, a planta homoplásmica foi obtida da transformação com o vetor pMR3 (Tabela 1).

Para a construção das curvas-padrão, alíquotas de DNA de planta transplastômica ou de plasmídeo foram diluídos em série (1:10) e amplificados com *primers* dos genes endógenos *rps14*, *matK* e *atpI*, e dos transgenes $\Delta 9$ *dessaturase* (pMR1), $\Delta 15$ *dessaturase* (pMR3) e *aadA* (Figura 6).

Figura 6 – Amplificação do gene *rps14* por PCR em tempo real. (A) Amplificação em série de 5 diluições (1:10) utilizando o plasmídeo; (B) Curva-padrão do gene *rps14*

As curvas desenhadas sobre plasmídeos e plantas foram iniciadas na concentração de 0,2 ng/ μ L e 20 ng/ μ L no primeiro ponto, respectivamente, sendo diluídas sequencialmente até o quinto ponto. A quantidade do transgene em cada uma das amostras foi estimada por meio da 'plotagem' dos resultados da PCR nas curvas-padrão.

A eficiência dos *primers* foi calculada de acordo com a equação (1) e apresentou valores entre 0,9 e 1,1 para cada gene. A amostra '100% planta transplastômica' foi definida como referência (calibrador) para o cálculo da quantidade de transgene nas demais amostras.

Na Tabela 3, os valores do grau de homoplasmia são referentes a razão entre a quantidade dos genes $\Delta 9$ *dessaturase* (pMR1) e *aadA* pela quantidade dos genes plastidiais controles *rps14* e *matK* em cada amostra. As misturas de DNA permitiram definir um grau de homoplasmia para linhagens transplastômicas.

Tabela 3 – Grau de homoplasma em amostras com diferentes misturas de DNA proveniente de uma planta transplastômica (pMR1) e de uma planta tipo selvagem, simulando variados graus de heteroplasma. As curvas-padrão foram construídas pela diluição seriada de DNA plasmidial ou de DNA de uma planta identificada como homoplásmica pelo teste de germinação de sementes. Foram amplificados os genes *rps14*, *matK* (controles endógenos), *Δ9 dessaturase* e *aadA* (transgenes). Os valores são referentes a razão entre a quantidade relativa do transgene pela quantidade relativa do gene endógeno em cada amostra

	% DNA de amostra										
Transplastômica	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
Tipo selvagem	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
DNA planta											
<i>rps14</i>											
<i>Δ9 des</i>	1,00	0,97	0,74	0,56	0,42	0,35	0,26	0,19	0,14	0,06	0,00
<i>aadA</i>	1,00	0,93	0,73	0,61	0,44	0,36	0,25	0,20	0,11	0,05	0,00
DNA plasmidial											
<i>rps14</i>											
<i>Δ9 des</i>	1,00	0,97	0,85	0,76	0,43	0,39	0,30	0,21	0,14	0,06	0,00
<i>aadA</i>	1,00	0,93	0,84	0,76	0,44	0,40	0,31	0,23	0,13	0,06	0,00
DNA planta											
<i>matK</i>											
<i>Δ9 des</i>	1,00	0,92	0,84	0,76	0,44	0,40	0,31	0,23	0,13	0,06	0,00
<i>aadA</i>	1,00	0,92	0,78	0,76	0,45	0,43	0,32	0,29	0,14	0,06	0,00

Para confirmar a eficiência da técnica e eliminar a possibilidade dos resultados terem sido obtidos ao acaso, o experimento foi repetido com outra planta transplastômica e outro plasmídeo (pMR3). Nesta segunda análise, foram utilizados como controle os genes *atpI* e *rps14* (Tabela 4). Assim como observado para o gene *matK* (Tabela 3), os índices de homoplasma permanecem estáveis quando quantificados com diferentes controles. A Figura 7 mostra que o gene plastidial controle *atpI* permaneceu constante em relação ao outro gene endógeno (*rps14*), enquanto os genes *aadA* e *Δ15 dessaturase* aumentaram proporcionalmente em relação a quantidade de genoma transplastômico presente na amostra.

Os resultados mostraram que, independente do gene controle utilizado, a técnica apresenta uma alta repetibilidade. Mesmo com a utilização de diferentes genes, *primers*, plasmídeos e plantas transplastômicas os resultados se mantiveram constantes e comprovaram a precisão e eficiência da técnica para análise de homoplasma (Tabela 4).

Figura 7 - Quantificação relativa (RQ) das misturas de DNA transplastômico e tipo selvagem. Os valores foram obtidos em relação ao gene *rps14*

Tabela 4 – Misturas de DNA de plantas transplastômicas (pMR3) e tipo selvagem, produzindo variados graus de heteroplasmia. As curvas-padrão foram construídas pela diluição seriada de DNA plasmidial ou de DNA de uma planta identificada como homoplásmica pelo teste de germinação de sementes. Foram amplificados os genes *rps14*, *atpI* (controles endógenos), $\Delta 15$ dessaturase e *aadA* (transgenes). Os valores são referentes a razão entre a quantidade relativa do transgene pela quantidade relativa do gene endógeno em cada amostra

Relativa de transgêno pela quantidade relativa do genô endogênico em cada amostra											
	% DNA de amostra										
Transplastômica	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
T. selvagem	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
DNA planta											
<i>rps14</i>											
$\Delta 15$ des	1,00	0,98	0,83	0,77	0,54	0,45	0,36	0,30	0,19	0,09	0,00
<i>aadA</i>	1,00	0,93	0,85	0,77	0,56	0,55	0,39	0,32	0,20	0,09	0,00
DNA plasmidial											
<i>rps14</i>											
$\Delta 15$ des	1,00	0,98	0,82	0,77	0,54	0,45	0,36	0,30	0,20	0,09	0,00
<i>aadA</i>	1,00	0,93	0,82	0,71	0,56	0,51	0,39	0,32	0,20	0,09	0,00
DNA planta											
<i>atpI</i>											
$\Delta 15$ des	1,00	0,96	0,87	0,61	0,53	0,40	0,37	0,28	0,22	0,08	0,00
<i>aadA</i>	1,00	0,93	0,84	0,67	0,61	0,48	0,37	0,30	0,24	0,09	0,00

Quando os genes endógenos *matK* (Tabela 3) e *atpI* (Tabela 4) foram utilizados como controle, para calcular o grau de homoplasmia, as curvas-padrão foram feitas somente em diluições de DNA de plantas pois esses genes não estão presentes nos plasmídeos.

4.5 Análise de plantas transplastômicas com genes ω -3 elongase (pMR5) e $\Delta 12/\omega 3$ dessaturase (pMR10)

Com base nos resultados apresentados acima, foi realizada a análise do índice de homoplasma em diferentes plantas transplastômicas provenientes da transformação com os vetores pMR5 e pMR10. Para a construção das curvas-padrão foram utilizados o gene endógeno *rps14* e o gene de seleção *aadA*.

As sementes produzidas pelos transformantes primários que cresceram em meio sem antibiótico foram germinadas em meio contendo espectinomicina (Item 3.6) e as plântulas que apresentaram coloração verde (pMR10-8), variegada (pMR10-25) e branca (pMR10-16) foram analisadas pela PCR em tempo real (Figura 8). Sementes provenientes de plantas transformadas com o vetor pMR5 (pMR5-5a e pMR5-5b) que passaram pelos ciclos de regeneração em meio com antibiótico foram germinadas em meio seletivo e apresentaram-se heteroplásmicas. Essas plântulas também foram utilizadas para avaliar o grau de homoplasma.

Os índices de homoplasma detectados na PCR em tempo real foram compatíveis aos resultados do teste de sementes, com valores abaixo de 1 para plantas heteroplásmicas, 1 para a planta homoplásmica e 0 para a plântulas brancas provenientes de teste de sementes. Nestas plântulas não foi detectado o gene de resistência *aadA* (Tabela 5).

Figura 8 – Plântulas em estado heteroplásmico apresentando o fenótipo variegado característico em meio de cultura contendo espectinomicina, utilizadas na técnica de PCR em tempo real. Barras: 2 mm

Tabela 5 – Determinação do grau de homoplasma pela técnica de PCR em tempo real. Valor ≥ 1 indica estado homoplásmico e valores < 1 indicam heteroplasma. O índice 0,00 equivale a não detecção do transgene

Plantas transplastômicas	Genes amplificados		Grau de homoplasma
pMR10-8	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,00
pMR10-16	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	0,00
pMR10-25	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	0,75
pMR5-5a	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	0,47
pMR5-5b	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	0,53

Além destas plantas, foram analisadas as 21 amostras de DNA de plantas transplastômicas para o gene $\Delta 12/\omega 3$ *dessaturase* (pMR10) extraído de folhas coletadas após o primeiro ciclo de regeneração em meio seletivo e que apresentaram PCR positiva para a inserção do transgene. Dentre estas, 8 amostras apresentaram índice de homoplasma menor que 1, sendo, portanto, consideradas heteroplásmicas em diferentes graus (Tabela 6).

Tabela 6 - Determinação do grau de homoplasma pela técnica de PCR em tempo real, em plantas transformadas com o plasmídeo pMR10 coletadas após o primeiro ciclo de regeneração. Valores próximos a 1 confirmam o estado homoplásmico, valores abaixo de 1 indicam heteroplasma

Plantas transplastômicas	Genes amplificados		Grau de homoplasma
pMR10-6	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,20 (ho)
pMR10-7	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,74 (ho)
pMR10-8	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,00 (ho)
pMR10-11	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,49 (ho)
pMR10-12	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,02 (ho)
pMR10-13	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	0,82 (he)
pMR10-14	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	0,83 (he)
pMR10-16	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,04 (ho)
pMR10-17	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	0,86 (he)
pMR10-18	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	0,84 (he)
pMR10-20	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,02 (ho)
pMR10-24	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	0,95 (he)
pMR10-25	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	0,83 (he)
pMR10-26	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,23 (ho)
pMR10-27	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,05 (ho)
pMR10-30	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,20 (ho)
pMR10-32	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,09 (ho)
pMR10-37	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	0,75 (he)
pMR10-39	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	0,95 (he)
pMR10-40	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,09 (ho)
pMR10-41	<i>rps14</i>	<i>aadA</i>	1,13 (ho)

5 DISCUSSÃO

Como os genomas plastidiais possuem um alto grau de ploidia (BOCK, 2001) e sua transformação inicia-se com a alteração de apenas um ou poucos genomas, vários ciclos de regeneração em meio seletivo são necessários para forçar o estado homoplásmico, onde todas as cópias do genoma são transplastômicas.

Cloroplastos apresentam excelentes perspectivas para expressão de transgenes visando alterar vias metabólicas (APEL; BOCK, 2009; WURBS; RUF; BOCK, 2007) ou para expressão de proteínas e compostos farmacêuticos (DANIELL, 2006; ZHOU et al., 2008). No entanto, o grau de homoplasma é essencial para atingir expressões máximas dos transgenes e evitar a produção de plantas transplastômicas instáveis. Plantas heteroplásmicas segregam seus genomas plastidiais ao acaso e, consequentemente, podem produzir setores homoplásmicos para o transgene inserido, heteroplásmicos (mistura dos dois genomas) e homoplásmicos para o tipo selvagem (BOCK; KHAN, 2004; ROGALSKI; RUF; BOCK, 2006; ROGALSKI et al., 2008).

Normalmente, a análise do grau de homoplasma é realizada utilizando-se dois testes: *Southern blot* (DANIELL et al., 2001; De COSA et al., 2001; KUMAR; DHINGRA; DANIELL, 2004a) e teste de herança da segregação do transgene no genoma plastidial através da germinação de sementes em meio seletivo (BOCK, 2001; BOCK; KHAN, 2004; MALIGA, 2004). O *Southern blot* é o teste molecular utilizado para mostrar o grau de homoplasma e também a correta inserção do gene de interesse no genoma plastidial. O DNA total é digerido com enzimas de restrição, os fragmentos são separados em gel de agarose, transferidos para uma membrana e hibridizados com uma sonda específica para a região alvo do genoma plastidial utilizada para a inserção dos genes de interesse. A ausência da banda relacionada ao fragmento tipo selvagem determina o estado homoplásmico. A presença tanto da banda tipo selvagem e do genoma transformado determina o estado heteroplásmico. Na grande maioria das vezes, essa técnica é realizada com a utilização de ^{32}P que necessita de condições especiais de manipulação e descarte, por ser um material radioativo. Existem kits não radioativos para análises de polimorfismo, porém estes não apresentam uma eficiência desejável. Além disso, é uma metodologia lenta e muito trabalhosa.

O teste de germinação de sementes possui uma alta margem de confiabilidade, porém, como esse teste é realizado somente após a produção de sementes, a análise de homoplasma torna-se mais trabalhosa e demorada, havendo ainda a probabilidade da planta ainda se encontrar em estado heteroplásmico.

Shen et al. (2010) publicaram um trabalho utilizando a técnica de PCR em tempo real para teste de homoplasma. No entanto, os autores mostraram o potencial da técnica baseando-se em análises de DNA plasmidial e poucos dados foram apresentados em relação ao DNA genômico.

O método estabelecido neste estudo fornece uma alternativa para determinar o grau de homoplasma de plantas transplastômicas sem a necessidade do teste de herança do transgene, sem a utilização de compostos radioativos e de maneira rápida e de fácil otimização.

A técnica de PCR semi-quantitativa foi realizada para avaliar o estado de homoplasma de plantas transplastômicas, mas os fragmentos amplificados não apresentam resultados conclusivos, uma vez que cópias do DNA plastidial estão presentes no núcleo celular. O genoma nuclear de fumo contém no seu DNA sequências altamente homólogas ao genoma plastidial, resultado da transferência e integração do DNA plastidial para o genoma nuclear durante a evolução das organelas e das plantas superiores (CHAN et al., 2011; GOULD; WALLER; McFADDEN, 2008; GREINER et al., 2011; TIMMIS et al., 2004; WOLF; ROPER; DUFFY, 2010). Estima-se que 15 ± 5 cópias do genoma plastidial estejam presentes por genoma nuclear haplóide (AYLIFFE; TIMMIS, 1992). Desta maneira, a visualização de bandas em géis de eletroforese não permite a diferenciação entre a amplificação das cópias do genoma nuclear e de cloroplastos não transformados.

Na PCR quantitativa em tempo real a cinética de amplificação do DNA é acompanhada pela quantidade de fluorescência emitida pela reação a cada ciclo. Devido ao caráter exponencial da amplificação, a quantidade de material genético na amostra inicial pode ser acessada através da análise logarítmica dos índices de fluorescência. Assim, o efeito da presença de um pequeno número de cópias do DNA plastidial no núcleo torna-se desprezível quando comparada às, aproximadamente, 10.000 cópias de cada gene presentes nos cloroplastos. Por exemplo, se

considerarmos uma planta homoplásmica fictícia, que não possui cópias de DNA plastidial no núcleo, teríamos 10.000 cópias/célula do gene *rps14* e o mesmo número de cópias para o gene de seleção *aadA*. O índice de homoplasma (n° cópias *aadA*: n° cópias *rps14*) seria igual a 1. Caso contrário, se as 15 cópias do gene *rps14* no núcleo forem consideradas, o índice de homoplasma passaria a 0,9985, o que, como observado em nossos resultados, não altera a classificação das plantas quanto ao grau de homoplasma. Além disso, a técnica de PCR em tempo real é muito mais sensível que a técnica de *Southern blot* utilizada na grande maioria dos trabalhos relacionados a transformação do genoma plastidial.

Estudos anteriores mostraram que plantas transplastômicas poderiam ser homoplásmicas na geração T0 ou após alguns ciclos de seleção (LI et al., 2006; SORIA-GUERRA et al., 2009). O monitoramento do grau de homoplasma na geração T0 das plantas transplastômicas possibilita a triagem precoce de plantas homoplásmicas e a redução do tempo para a obtenção de plantas transformadas.

Neste estudo, o vetor de expressão foi inserido no genoma do cloroplasto de fumo e a PCR tradicional foi realizada para selecionar plantas transplastômicas positivas que foram usadas para análises posteriores. O grau de homoplasma das plantas transplastômicas foi analisado pela técnica de PCR em tempo real. Os índices observados mostraram pouca variação independentemente do DNA utilizado, indicando que o método é confiável e eficaz.

Os resultados mostraram que o grau de homoplasma pode ser medido através do cálculo da quantificação do transgene dividido pelo gene endógeno controle. As análises das amostras colhidas após o primeiro ciclo de regeneração mostraram que 13 das 21 plantas já alcançaram o estado homoplásmico e não necessitam de mais ciclos de seleção para adquirir estabilidade.

Em algumas plantas transplastômicas observaram-se valores elevados (acima de 1,20) para o índice de homoplasma. Por definição, no estado homoplásmico, uma cópia do gene controle (gene endógeno) deve estar presente para cada cópia do transgene. Recentemente, alguns trabalhos demonstraram que o uso de sinais de genes internos (promotores, 5'-UTRs e 3'-UTRs) para expressão de transgenes pode desencadear recombinações e criar isoformas instáveis deletando partes do genoma e,

consequentemente, genes essenciais (McCABE et al., 2008; ROGALSKI; RUF; BOCK, 2006; ROGALSKI et al., 2008; ZHOU et al., 2008). Essas recombinações podem causar novas isoformas criando genomas menores e diminuindo o número total de alguns genes influenciando os resultados obtidos. Porém, a causa deste desvio nos dados permanece ainda a ser investigada.

6 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados apresentados, conclui-se que:

- Plantas transplastômicas para o gene $\Delta 12/\omega 3$ *dessaturase* (pMR10) foram obtidas utilizando o vetor pMR10.
- Análise de homoplasma de transgene no genoma plastidial de fumo não é possível por PCR devido a presença de cópias do genoma plastidial no núcleo.
- Germinação de sementes é um método eficaz para análise do grau de homoplasma em plantas transplastômicas, mas depende de um ciclo de reprodução de sementes.
- A PCR em tempo real mostrou ser um método muito rápido e eficaz para análise do grau de homoplasma de plantas transplastômicas.

REFERÊNCIAS

ALLISON, L.A.; MALIGA, P. Light-responsive and transcription-enhancing elements regulate the plastid psbD core promoter. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 14, n. 15, p. 3721-3730, 1995.

APEL, W.; BOCK, R. Enhancement of carotenoid biosynthesis in transplastomic tomatoes by induced lycopene-to-provitamin A conversion. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2009.

AYLIFFE, M.A.; TIMMIS, J.N. Tobacco nuclear DNA contains long tracts of homology to chloroplast DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, n. 2/3, p. 229-238, 1992.

BARONE, P.; ZHANG, X.-H.; WIDHOLM, J.M. Tobacco plastid transformation using the feedback-insensitive anthranilate synthase [α]-subunit of tobacco (ASA2) as a new selectable marker. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 11, p. 3195-3202, 2009.

BENDICH, A.J. Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? **Bioessays**, Cambridge, v. 6, n. 6, p. 279-282, 1987.

BIRCH-MACHIN, I.; NEWELL, C.A.; HIBBERD, J.M.; GRAY, J.C. Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 261-270, 2004.

BOCK, R. Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 18, n. 2, p. 100-106, 2007a.

_____. Structure, function, and inheritance of plastid genomes. In: _____. **Cell and molecular biology of plastids**. Göteborg: Göteborg University, 2007b. p. 29-64.

_____. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 312, n. 3, p. 425-438, 2001.

BOCK, R.; KHAN, M.S. Taming plastids for a green future. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 22, n. 6, p. 311-318, 2004.

BOYNTON, J.E.; GILLHAM, N.W.; HARRIS, E.H.; HOSLER, J.P.; JOHNSON, A.M.; JONES, A.R.; RANDOLPH-ANDERSON, B.L.; ROBERTSON, D.; KLEIN, T.M.; SHARK, K.B.; SANFORD, J.C. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. **Science**, Washington, v. 240, n. 4858, p. 1534-1538, 1988.

CAHOON, E.B.; SHOCKEY, J.M.; DIETRICH, C.R.; GIDDA, S.K.; MULLEN, R.T.; DYER, J.M. Engineering oilseeds for sustainable production of industrial and nutritional feedstocks: solving bottlenecks in fatty acid flux. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 10, n. 3, p. 236-244, 2007.

CARRER, H.; MALIGA, P. Targeted insertion of foreign genes into the tobacco plastid genome without physical linkage to the selectable marker gene. **Bio/Technology**, New York, v. 13, n. 8, p. 791-794, 1995.

CARRER, H.; HOCKENBERRY, T.N.; SVAB, Z.; MALIGA, P. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 241, n. 1/2, p. 49-56, 1993.

CERUTTI, H.; OSMAN, M.; GRANDONI, P.; JAGENDORF, A.T. A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 17, p. 8068-8072, 1992.

CHAN, C.X.; GROSS, J.; YOON, H.S.; BHATTACHARYA, D. Plastid origin and evolution: new models provide insights into old problems. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 155, n. 4, p. 1552-1560, 2011.

CHANDRA, A.; PENTAL, D. Regeneration and genetic transformation of grain legumes: an overview. **Current Science**, Bangalore, v. 84, n. 3, p. 381-387, 2003.

CHEBOLU, S.; DANIELL, H. Stable expression of Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 230-239, 2007.

CLARKE, J.L.; DANIELL, H. Plastid biotechnology for crop production: present status e future perspectives. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 76, n. 3/5, p. 209-220, 2011.

CORNEILLE, S.; LUTZ, K.; SVAB, Z.; MALIGA, P. Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system. **The Plant Journal**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 171-178, 2001.

CRAIG, W.; LENZI, P.; SCOTTI, N.; De PALMA, M.; SAGGESE, P.; CARBONE, V.; CURRAN, N.M.; MAGEE, A.M.; MEDGYESY, P.; KAVANAGH, T.A.; DIX, P.J.; GRILLO, S.; CARDI, T. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance. **Transgenic Research**, London, v. 17, n. 5, p. 769-782, 2008.

DAMUDE, H.G.; KINNEY, A.J. Engineering oilseeds to produce nutritional fatty acids. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 132, n. 1, p. 1-10, 2008.

DAMUDE, H.G.; ZHANG, H.; FARRALL, L.; RIPP, K.G.; TOMB, J.-F.; HOLLERBACH, D.; YADAV, N.S. Identification of bifunctional $\Delta 12/\omega 3$ fatty acid desaturases for improving the ratio of $\omega 3$ to $\omega 6$ fatty acids in microbes and plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 25, p. 9446-9451, 2006.

DANIELL, H. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 1, n. 10, p. 1071-1079, 2006.

_____. Transgene containment by maternal inheritance: effective or elusive? **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 17, p. 6879-6880, 2007.

DANIELL, H.; LEE, S.B.; PAHCHAL, T.; WIEBE, P. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 311, n. 5, p. 1001-1009, 2001.

De COSA, B.; MOAR, W.; LEE, S.-B.; MILLER, M.; DANIELL, H. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, n. 1, p. 71-74, 2001.

DeGRAY, G.; RAJASEKARAN, K.; SMITH, F.; SAFORD, J.; DANIELL, H. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 127, n. 3, p. 852-862, 2001.

DING, J.; JIA, J.; YANG, L.; WEN, H.; ZHANG, C.; LIU, W.; ZHANG, D. Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 11, p. 3372-3377, 2004.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Washington, v. 12, p. 13-15, 1990.

DRESCHER, A.; RUF, S.; CALSA, T. Jr.; CARRER, H.; BOCK, R. The two largest chloroplast genome-encoded reading frames of higher plants are essential genes. **The Plant Journal**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 97-104, 2000.

DUFOURMANTEL, N.; PELISSIER, B.; GARÇON, F.; PELTIER, G.; ERULLO, J.M.; TISSOT, G. Generation of fertile transplastomic soybean. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 55, n. 4, p. 479-489, 2004.

DURRETT, T.P.; BENNING, C.; OHLROGGE, J. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 593-607, 2008.

EIBL, C.; ZOU, Z.; BECK, A.; KIM, M.; MULLET, J.; KOOP, H.-U. *In vivo* analysis of plastid *psbA*, *rbcL* and *rpl32* UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. **The Plant Journal**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 333-345, 1999.

FERNANDEZ-SAN, M.A.; MINGEO-CASTEL, A.M.; MILLER, M.; DANIELL, H. A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 71-79, 2003.

GIDDINGS, G.; ALLISON, G.; BROOKS, D.; CARTER, A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 11, p. 1151-1155, 2000.

GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.

GOLDS, T.; MALIGA, P.; KOOP, H.-U. Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. **Bio/Technology**, New York, v. 11, n. 1, p. 95-97, 1993.

GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M. Transgenic expression of aminoglycoside adenyl transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n. 15, p. 4083-4089, 1991.

GOULD, S.B.; WALLER, R.F.; McFADDEN, G.I. Plastid evolution. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 491-517, 2008.

GRAEF, G.; LaVALLE, B.J.; TENOPIR, P.; TAT, M.; SCHWEIGER, B.; KINNEY, A.J.; Van GERPEN, J.H.; CLEMENTE, T.E. A high-oleic-acid and low-palmitic acid soybean: agronomic performance and evaluation as a feedstock for biodiesel. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 411-421, 2009.

GRAY, B.N.; AHNER, B.A.; HANSON, M.R. High-level bacterial cellulose accumulation in chloroplast-transformed tobacco mediated by downstream box fusions. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 102, n. 4, p. 1045-1054, 2009.

GREINER, S.; RAUWOLF, U.; MEURER, J.; HERRMANN, R.G. The role of plastids in plant speciation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 671-91, 2011.

GUDA, C.; LEE, S.B.; DANIELL, H. Stable expression of a biodegradable protein-based polymer in tobacco chloroplasts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, n. 3, p. 257-262, 2000.

GUNSTONE, F.D. Soybeans pace boost in oilseed production. **Inform**, Silver Spring, v. 11, p. 1287-1289, 2001.

GUNSTONE, F.D.; ALANDER, J.; ERHAN, S.Z.; SHARMA, B.K.; McKEON, T.A.; LIN, J.-T. Nonfood uses of oils and fats. In: GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; DIJKSTRA, A.J. (Ed.). **The lipid handbook**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. p. 591-636.

HAGEMANN, R. Plastid genetics in higher plants. In: HERRMANN, R.G. (Ed.). **Cell organelles**. Berlin: Springer Verlag, 1992. p. 65-96.

_____. The sexual inheritance of plant organelles. In: DANIELL, H.; CHASE, C. (Ed.). **Molecular biology and biotechnology of plant organelles**. Dordrecht: Springer, 2004. p. 93-113.

HAGER, M.; BIEHLER, K.; ILLERHAUS, J.; RUF, S.; BOCK, R. Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome b6f complex. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 18, n. 21, p. 5834-5842, 1999.

HAJDUKIEWICZ, P.T.J.; GILBERTSON, L.; STAUB, J.M. Multiple pathways for CRE/lox-mediated recombination in plastids. **The Plant Journal**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 161-170, 2001.

HASTINGS, N.; AGABA, M.; TOCHER, D.R.; LEAVER, M.J.; DICK, J.R.; SARGENT, J.R.; TEALE, A.J. A vertebrate fatty acid desaturase with Delta 5 and Delta 6 activities. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 25, p. 14304-14309, 2001.

HASUNUMA, T.; MIYAZAWA, S.I.; YOSHIMURA, S.; SHINZAKI, Y.; TOMIZAWA, K.I.; SHINDO, K.; CHOI, S.K.; MISAWA, N.; MIYAKE, C. Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. **The Plant Journal**, Oxford, v. 55, n. 5, p. 857-868, 2008.

HITES, R.A.; FORAN, J.A.; CARPENTER, D.O.; HAMILTON, M.C.; KNUTH, B.A.; SCHWAGE, S.J. Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. **Science**, Washington, v. 303, n. 5655, p. 226-229, 2004.

IAMTHAM, S.; DAY, A. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 18, p. 1172-1176, 2000.

JACOBS, M.N.; COVACI, A.; GHEORGHE, A.; SCHEPENS, P. Time trend investigation of PCBs, PBDEs, and organochlorine pesticides in selected n-3 polyunsaturated fatty acid rich dietary fish oil and vegetable oil supplements; nutritional relevance for human essential n-3 fatty acid requirements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 6, p. 1780-1788, 2004.

KANAMOTO, H.; YAMASHITA, A.; ASAO, H.; OKUMURA, S.; TAKASE, H.; HATTORI, M.; YOKOTA, A.; TOMIZAWA, K. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. **Transgenic Research**, London, v. 15, n. 2, p. 205-217, 2006.

KARCHER, D.; KAHLAU, S.; BOCK, R. Faithful editing of a tomato-specific mRNA editing site in transgenic tobacco chloroplasts. **RNA**, New York, v. 14, n. 2, p. 217-224, 2008.

KAVANAGH, T.A.; THANH, N.D.; LAO, N.T.; McGRATH, N.; PETER, S.O.; HORVÁTH, E.M.; DIX, P.J.; MEDGYESY, P. Homeologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. **Genetics**, Austin, v. 152, n. 3, p. 1111-1122, 1999.

KHAN, M.S.; MALIGA, P. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, n. 17, p. 910-915, 1999.

KITTIWONGWATTANA, C.; LUTZ, K.; CLARK, M.; MALIGA, P. Plastid marker gene excision by the phiC31 phage site-specific recombinase. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 64, n. 1-2, p. 137-143, 2007.

KNOBLAUCH, M.; HIBBERD, J.M.; GRAY, J.C.; van BEL, A.J.E. A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, n. 9, p. 906-910, 1999.

KOYA, V.; MOAYERI, M.; LEPPLA, S.H.; DANIELL, H. Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 12, p. 8266-8274, 2005.

KRICHEVSKY, A.; MEYERS, B.; VAINSTEIN, A.; MALIGA, P.; CITOVSKY, V. Autoluminescent plants. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 11, e15461, 2010.

KUMAR, S.; DHINGRA, A.; DANIELL, H. Plastid-expressed *betaine aldehyde dehydrogenase* gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 136, n. 1, p. 2843-2854, 2004a.

_____. Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, n. 2, p. 203-216, 2004b.

LANDS, W.E.M. Dietary fat and health: the evidence and the politics of prevention: careful use of dietary fats can improve life and prevent disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1055, p. 179-1992, 2005.

LEE, S.-B.; KWON, H.; KWON, S.; PARK, S.; JEONG, M.; HAN, S.; DANIELL, H. Accumulation of trehalose within transgenic chloroplast confers drought tolerance. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2003.

LEELAVATHI, S.; REDDY, V. Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 11, n. 1, p. 49-58, 2003.

LI, W.; RUF, S.; BOCK, R. Chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker for plastid transformation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 76, n. 3/5, p. 443-451, 2011.

LI, Y.; SUN, M.; LIU, J.; YANG, Z.; ZHANG, Z.; SHEN, G. High expression of foot-and-mouth disease virus structural protein VP1 in tobacco chloroplasts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, n. 4, p. 329-333, 2006.

LIU, C.W.; LIN, C.C.; CHEN, J.J.W.; TSENG, M.J. Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) by particle bombardment. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 26, n. 10, p. 1733-1744, 2007.

LOESSL, A.; BOHMERT, K.; HARLOFF, H.; EIBL, C.; MÜHLBAUER, S.; KOOP, H.-U. Inducible trans-activation of plastid transgenes: expression of the *R. eutrophaphb* operon in transplastomic tobacco. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 9, p. 1462-1471, 2005.

LOPEZ-JUEZ, E.; PYKE, K.A. Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. **The International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 49, n. 5/6, p. 557-577, 2005.

LU, C.; NAPIER, J.A.; CLEMENTE, T.E.; CAHOON, E.B. New frontiers in oilseed biotechnology: meeting the global demand for vegetable oils for food, feed, biofuel, and industrial applications. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 22, n. 2, p. 1-8, 2010.

MADOKA, Y.; TOMIZAWA, K.I.; MIZOI, J.; NISHIDA, I.; NAGANO, Y.; SASAKI, Y. Chloroplast transformation with modified *accD* operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 43, n. 12, p. 1518-1525, 2002.

MALIGA, P. Plastid transformation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 289-313, 2004.

MALIGA, P.; BOCK, R. Plastid biotechnology: food, fuel and medicine for the 21st century. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 155, n. 4, p. 1501-1510, 2011.

MALIGA, P.; NIXON, P.J. Judging the homoplastomic state of plastid transformants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 3, n. 10, p. 376-377, 1998.

MARCHIS, F.D.; WANG, Y.; STEVANATO, P.; ARCIONI, S.; BELLUCCI, M. Genetic transformation of the sugar beet plastome. **Transgenic Research**, London, v. 18, n. 1, p. 17-30, 2009.

MARTIN, W.; HERRMANN, R.G. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 118, n. 1, p. 9-17, 1998.

MASON, G.; PROVERO, P.; VAIRA, A.M.; ACCOTTO, G.P. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. **BMC Biotechnology**, London, v. 2, p. 20, 2002.

McBRIDE, K.; SVAB, Z.; SCHAAF, D.; HOGAN, P.; STALKER, D.; MALIGA, P. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. **Bio/Technology**, New York, v. 13, n. 4, p. 362-365, 1995.

McCABE, M.S.; KLAAS, M.; GONZALEZ-RABADE, N.; POAGE, M.; BADILLO-CORONA, J.A.; ZHOU, F.; KARCHER, D.; BOCK, R.; GRAY, J.C.; DIX, P.J. Plastid transformation of high-biomass tobacco variety Maryland Mammoth for production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 914-929, 2008.

MOLINA, A.; HERVA-STUBBS, S.; DANIELL, H.; MINGO-CASTEL, A.M.; VERAMENDI, J. High-yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 141-153, 2004.

MU, J.; TAN, H.; ZHENG, Q.; FU, F.; LIANG, Y.; ZHANG, J.; YANG, X.; WANG, T.; CHONG, K.; WANG, X.-J.; ZUO, J. *LEAFY COTYLEDON1* is a key regulator of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 148, n. 2, p. 1042-1054, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAPIER, J.A. The production of unusual fatty acids in transgenic plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 295-319, 2007.

NAPIER, J.A.; GRAHAM, I.A. Tailoring plant lipid composition: designer oilseed come of age. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, n. 3, p. 330-337, 2010.

NUGENT, G.D.; COYNE, S.; NGUYEN, T.T.; KAVANAGH, T.A.; DIX, P.J. Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. *botrytis* (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplast. **Plant Science**, Limerick, v. 170, n. 1, p. 35-142, 2006.

OEY, M.; LOHSE, M.; KREIKEMEYER, B.; BOCK, R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. **The Plant Journal**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 436-445, 2009.

OHLROGGE, J.; BROWSE, J. Lipid Biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 957-970, 1995.

OKUMURA, S.; SAWADA, M.; PARK, Y.W.; HAYASHI, T.; SHIMAMURA, M.; TAKASE, H.; TOMIZAWA, K. Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts. **Transgenic Research**, London, v. 15, n. 5, p. 637-646, 2006.

O'NEIL, C.; HORVATH, G.V.; HORVATH, E.; DIX, P.J.; MEDGYESY, P. Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 729-738, 1993.

PAULY, D.; CHRISTENSEN, V.; GUENETTE, S.; PITCHER, T.J.; SUMAILA, U.R.; WALTERS, C.J.; WATSON, R.; ZELLER, D. Towards sustainability in world fisheries. **Nature**, London, v. 418, n. 6898, p. 689-695, 2002.

PYKE, K.A. Plastid biogenesis and differentiation. In: BOCK, R. (Ed.). **Cell and molecular biology of plastids**. Göteborg: Göteborg University, 2007. p. 1-28.

QI, B.; FRASER, T.; MUGFORD, S.; DOBSON, G.; SAYANOVA, O.; BUTLER, J.; NAPIER, J.A.; STOBART, A.K.; LAZARUS, C.M. Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 22, n. 6, p. 739-745, 2004.

QUESADA-VARGAS, T.; RUIZ, O.N.; DANIELL, H. Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplasts: transcription, processing, and translation. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 138, n. 3, p. 1746-1762, 2005.

ROGALSKI, M.; CARRER, H. Engineering plastid fatty acid biosynthesis to improve food quality and biofuel production in higher plants. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 554-564, 2011.

ROGALSKI, M.; RUF, S.; BOCK, R. Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 34, n. 16, p. 4537-4545, 2006.

ROGALSKI, M.; SCHOETTLER, M.A.; THIELE, W.; SCHULZE, W.X.; BOCK, R. Rpl33, a nonessential plastid encoded ribosomal protein in tobacco, is required under cold stress conditions. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 8, p. 2221-2237, 2008.

RUF, S.; KARCHER, D.; BOCK, R. Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 17, p. 6998-7002, 2007.

RUF, S.; KÖSSEL, H.; BOCK, R. Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 139, n. 1, p. 95-102, 1997.

RUF, S.; HERMANN, M.; BERGER, I.J.; CARRER, H.; BOCK, R. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, n. 9, p. 870-875, 2001.

RUIZ, O.N.; DANIELL, H. Genetic engineering to enhance mercury phytoremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, n. 2, p. 213-219, 2009.

RUIZ, O.N.; HUSSEIN, S.; TERRY, N.; DANIELL, H. Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 132, n. 3, p. 1344-1352, 2003.

RUIZ, O.N.; ALVAREZ, D.; TORRES, C.; ROMAN, L.; DANIELL, H. Metallothionein expression in chloroplasts enhances Mercury accumulation and phytoremediation capability. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 609-617, 2011.

RUHLMAN, T.; VERMA, D.; SAMSON, N.; DANIELL, H. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 152, n. 4, p. 2088-2104, 2010.

RUHLMAN, T.; AHANGARI, R.; DEVINE, A.; SAMSAM, M.; DANIELL, H. Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts - oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 495-510, 2007.

SAKAMOTO, T.; WADA, H.; NISHIDA, I.; OHMORI, M.; MURATA, N. Delta 9 acyl-lipid desaturases of cyanobacteria. Molecular cloning and substrate specificities in terms of fatty acids, sn-positions, and polar head groups. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, n. 41, p. 25576-25580, 1994a.

SAKAMOTO, T.; LOS, D.A.; HIGASHI, S.; WADA, H.; NISHIDA, I.; OHMORI, M.; MURATA, N. Cloning of ω -3 desaturase from cyanobacteria and its use in altering the degree of membrane-lipid unsaturation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 249-63, 1994b.

SARGENT, J.R. Fish oils and human diet. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 78, s. 1, S5-S13, 1997.

SAYANOVA, O.V.; NAPIER, J.A. Eicosapentaenoic acid: biosynthetic route and the potential for synthesis in transgenic plants. **Phytochemistry**, New York, v. 65, n. 2, p. 147-158, 2004.

SCOTTI, N.; ALAGNA, F.; FERRAILOLO, E.; FORMISANO, G.; SANNINO, L.; BUONAGURO, L.; De STRADIS, A.; VITALE, A.; MONTI, L.; GRILLO, S.; BUONAGURO, F.M.; CARDI, T. High-level expression of the HIV-1 Pr55 (gag) polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts. **Planta**, Berlin, v. 229, n. 5, p. 1109-1122, 2009.

SERINO, G.; MALIGA, P. A negative selection scheme based on the expression of cytosine deaminase in plastids. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 697-701, 1997.

SHARWOOD, R.E.; Von CAEMMERER, S.; MALIGA, P.; WHITNEY, S.M. The catalytic properties of hybrid Rubisco comprising tobacco small and sunflower large subunits mirror the kinetically equivalent source Rubiscos and can support tobacco growth. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 146, n. 1, p. 83-96, 2008.

SHEN, H.; QIAN, B.; YANG, L.; LIANG, W.; CHEN, W.; LIU, Z.; ZHANG, D. Estimation of the homoplasmy degree for transplastomic tobacco using quantitative real-time PCR. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 231, n. 1, p. 143-150, 2010.

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 70, s. 3, p. 560–569, 1999.

_____. Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 7, p. 961-970, 2000.

SINGH, S.P.; ZHOU, X.R.; LIU, Q.; STYMNE, S.; GREEN, A.G. Metabolic engineering of new fatty acids in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, n. 2, p. 197-203, 2005.

SKARJINSKAIA, M.; SVAB, Z.; MALIGA, P. Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicacea. **Transgenic Research**, London, v. 12, n. 1, p. 115-122, 2003.

SMITH, W. Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 17, n. 2, p. 174-182, 2005.

SORIA-GUERRA, R.E.; ALPUCHE-SOLIS, A.G.; ROSALES-MENDOZA, S.; MORENO-FIERROS, L.; BENDIK, E.M.; MARTINEZ-GONZALEZ, L.; KORBAN, S.S. Expression of a multi-epitope DPT fusion protein in transplastomic tobacco plants retains both antigenicity and immunogenicity of all three components of the functional oligomer. **Planta**, Berlin, v. 229, n. 6, p. 1293-1302, 2009.

SPRECHER, H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1486, n. 2/3, p. 219-231, 2000.

SUGIURA, M. The chloroplast chromosomes in land plants. **Annual Review of Cell Biology**, Palo Alto, v. 5, p. 51-70, 1989.

_____. The chloroplast genome. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 19, n. 1, p. 149-168, 1992.

STAUB, J.M.; MALIGA, P. Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 1, p. 39-45, 1992.

_____. Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the *psbA* mRNA. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 601-606, 1993.

STAUB, J.M.; GARCIA, B.; GRAVES, J.; HAJDUKIEWICZ, P.T.; HUNTER P.; NEHRA, N.; PARADKAR, V.; SCHLITTLER, M.; CARROLL, J.A.; SPATOLA, L.; WARD, D.; YE, G.; RUSSELL, D.A. High yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 3, p. 333-338, 2000.

SVAB, Z.; MALIGA, P. Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 17, p. 7003-7008, 2007.

_____. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 3, p. 913-917, 1993.

SVAB, Z.; HAJDUKIEWITZ, P.T.J.; MALIGA, P. Stable transformation of plastids in higher plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 87, n. 21, p. 8526-8530, 1990.

SWIATEK, M.; GREINER, S.; KEMP, S.; DRESCHER, A.; KOOP, H.U.; HERRMANN, R.G.; MAIER, R.M. PCR analysis of pulsed-field gel electrophoresis-purified plastid DNA, a sensitive tool to judge the hetero-/homoplastomic status of plastid transformants. **Current Genetics**, Bangalore, v. 43, n. 1, p. 45-53, 2003.

TIMMIS, J.N.; AYLIFFE, M.A.; HUANG, C.Y.; MARTIN, W. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, n. 2, p. 123-136, 2004.

TREGONING, J.S.; NIXON, P.; KURODA, H.; SVAB, Z.; CLARE, S.; BOWE, F.; FAIRWEATHER, N.; YTTERBERG, J.; Van WIJK, K.J.; DOUGAN, G.; MALIGA, P. Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 1174-1179, 2003.

TUNGSUCHAT-HUANG, T.; SLIVINSKI, K.M.; SINAGAWA-GARCIA, S.R.; MALIGA, P. Visual spectinomycin resistance (*aadAau*) gene for facile identification of transplastomic sectors in tobacco leaves. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 76, n. 3/5, p. 453-461, 2011.

VALKOV, V.T.; GARGANO, D.; MANNA, C.; FORMISANO, G.; DIX, P.J.; GRAY, J.C.; SCOTTI, N.; CARDI, T. High efficiency plastid transformation in potato and regulation of transgene expression in leaves and tubers by alternative 5' and 3' regulatory sequences. **Transgenic Research**, London, v. 20, 137–151, 2010.

VERMA, D.; DANIELL, H. Chloroplast vector systems for biotechnology applications. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 145, n. 4, p. 1129-1143, 2007.

VERMA, D.; KANAGARAJ, A.; JIN, S.; SINGH, N.D.; KOLATTUKUDY, P.E.; DANIELL, H. Chloroplast-derived enzyme cocktails hydrolyse lignocellulosic biomass and release fermentable sugars. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 332-350, 2010.

WHITNEY, S.M.; ANDREWS, T.J. Photosynthesis and growth of tobacco with substituted bacterial Rubisco mirror the properties of the introduced enzyme. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 133, n. 1, p. 287-294, 2003.

_____. Plastome-encoded bacterial ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) supports photosynthesis and growth of tobacco. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 25, p. 14738-14743, 2001.

WOLF, P.G.; ROPER, J.M.; DUFFY, A.M. The evolution of chloroplast genome structure in ferns. **Genome**, Ottawa, v. 53, n. 9, p. 731-738, 2010.

WU, G.; TRUSKA, M.; DALTA, N.; VRINTEN, P.; BAUER, J.; ZANK, T.; CIRPUS, P.; QIU, X. Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 23, n. 8, p. 1013-1017, 2005.

WURBS, D.; RUF, S.; BOCK, R. Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. **The Plant Journal**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 276-288, 2007.

YANG, L.; DING, J.; ZHANG, C.; JIA, J.; WENG, H.; LIU, W.; ZHANG, D. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 23, n. 10-11, p. 759-763, 2005a.

YANG, L.; PAN, A.; JIA, J.; DING, J.; CHEN, J.; CHENG, H.; ZHANG, C.; ZHANG, D. Validation of a tomato-specific gene, *LAT52*, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 2, p. 183-190, 2005b.

YE, G.-N.; HAJDUKIEWICZ, P.T.J.; BROYLES, D.; RODRIGUEZ, D.; XU, C.W.; NEHRA, N.; STAUB, J.M. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. **The Plant Journal**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 261-270, 2001.

ZHANG, X-H.; BROTHERTON, J.E.; WIDHOLM, J.M.; PORTIS Jr., A.R. Targeting a nuclear anthranilate synthase α -subunit gene to the tobacco plastid genome results in enhanced tryptophan biosynthesis. Return of a gene to its pre-endosymbiotic origin. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 127, n. 1, p. 131-141, 2011.

ZHOU, F.; BADILLO-CORONA, J.A.; KARCHER, D.; GONZALEZ-RABADE, N.; PIEPENBURG, K.; BORCHERS, A.M.; MALONEY, A.P.; KAVANAGH, T.A.; GRAY, J.C.; BOCK, R. High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 897-913, 2008.

ZUBKOT, M.K.; ZUBKOT, E.I.; Van ZULIEN, K.; MEEYER, P.; DAY, A. Stable transformation of petunia plastids. **Transgenic Research**, London, v. 13, n. 6, p. 523-530, 2004.