



Gene Marcador Seletivo

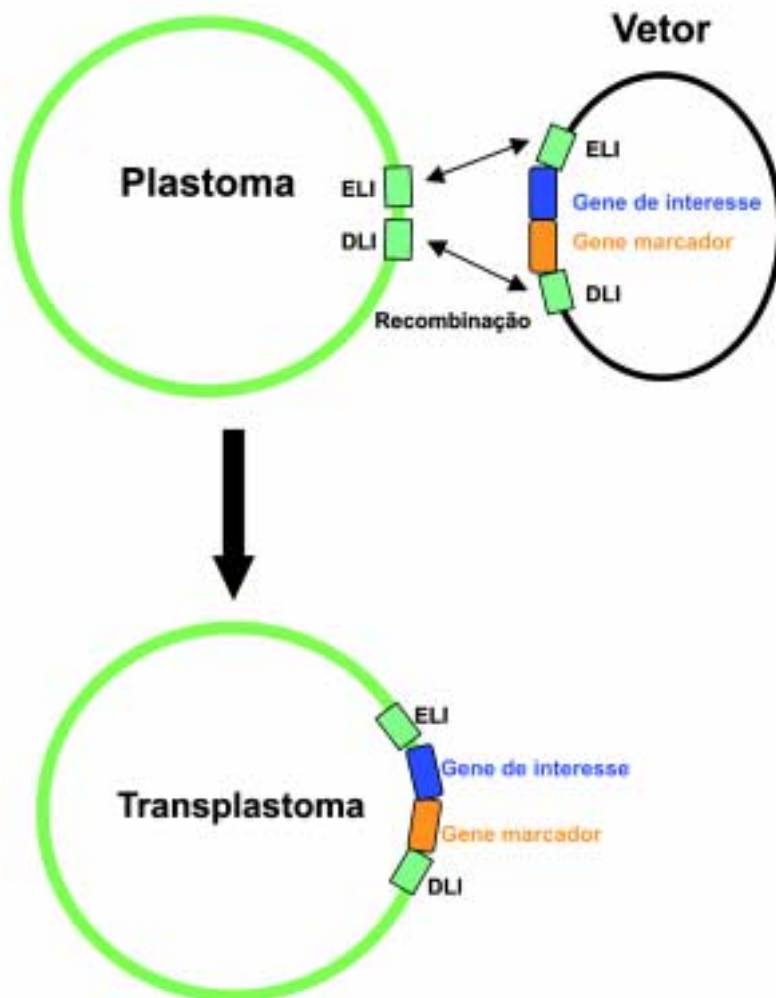
Ilustrações cedidas pela autora

Como eliminar o gene marcador seletivo em cloroplastos transformados

Helaine Carrer, PhD

Profa. do Departamento de Ciências
Biológicas, ESALQ/USP
becarrer@esalq.usp.br

Figura 1. Transformação de cloroplastos. A integração de um novo gene no genoma do cloroplasto (Plastoma) ocorre por dois eventos de recombinação homóloga. No vetor, o gene de interesse está ligado ao gene marcador seletivo e são flanqueados por seqüências homólogas do cloroplasto, que determinam o local de inserção. Após recombinação, o genoma do cloroplasto transformado (Transplastoma) passa a expressar o gene marcador e o gene de interesse introduzido. (DLI, Direita do Local de Inserção; ELI, Esquerda do Local de Inserção)



Introdução

O desenvolvimento de processos de eliminação do gene marcador seletivo torna-se um requisito na tecnologia de transformação de cloroplastos de plantas, principalmente por três motivos bastante marcantes: 1) o genoma cloroplastidial é poliplóide levando a altos níveis de expressão da proteína referente ao gene introduzido nessa organela; 2) o gene marcador seletivo mais efetivo para a obtenção das plantas transplastômicas é o gene bacteriano *aadA*, que confere resistência aos antibióticos espectinomomicina e estreptomicina; e 3) a possibilidade de reutilização desse gene marcador seria útil para introdução de diferentes genes de interesse em diferentes regiões do genoma. Neste artigo são descritos alguns métodos que estão sendo desenvolvidos para obtenção de plantas transplastômicas livres do gene marcador seletivo.

O Genoma de Cloroplastos de Plantas

Em geral, o genoma de cloroplastos de plantas possui entre 120 a 160 kb que codifica em torno de 120 genes, sendo que cada célula vegetal possui cerca de 10.000 cópias idênticas do genoma (Bendich, 1987). Apesar do pequeno tamanho desse genoma, quando comparado com o genoma nuclear de plantas, a quantidade de DNA cloroplastidial de uma célula representa entre 10% a 20% devido à sua poliploidia. A organização dos genes no genoma de organelas, como o cloroplasto e a mitocôndria, ocorre na forma de operons, os quais mantêm o mecanismo procariótico de expressão dos genes (Goldschmidt-Clermont,

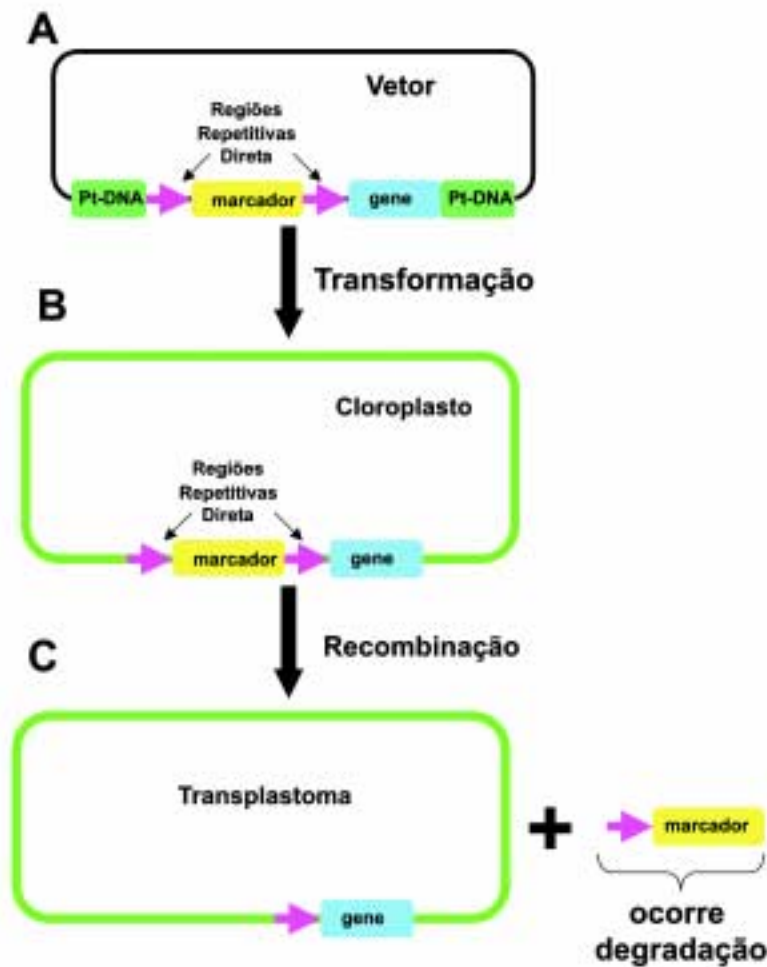


Figura 2. Eliminação do gene marcador por *loop-out* das seqüências repetitivas diretas. (A) vetor de transformação de cloroplastos apresentando o gene marcador seletivo (amarelo) entre duas regiões repetitivas diretas (roséa) ligado ao gene de interesse (azul). A região do vetor é flanqueada por seqüências homólogas do cloroplasto (Pt-DNA) que localizam o local de inserção do gene de interesse por dois eventos de recombinação homóloga. (B) Cloroplasto transformado contendo o gene de interesse e o marcador seletivo flanqueado com as seqüências repetitivas diretas. Após novo evento de recombinação intramolecular entre as regiões repetitivas diretas, ocorre a excisão do gene marcador seletivo por *loop-out* em meio não-seletivo (C) O transplastoma possuirá somente o gene de interesse e uma cópia das seqüências repetitivas direta. Devido ao gene marcador seletivo estar ligado a outra seqüência repetitiva e como não possui origem de replicação e outras seqüências necessárias à sua estabilidade, esse segmento do DNA é degradado por enzimas DNAases endógenas

1998; Coleman e Norozzi, 1999). Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para entender o sofisticado mecanismo de regulação governando a co-operação das organelas com o compartimento núcleo-citoplasmático das células vegetais.

Com o desenvolvimento da tecnologia de transformação de cloroplastos da alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Boyton et al, 1988) e da planta de fumo (*Nicotiana tabacum*) (Svab et

al., 1990), tornou-se possível a manipulação das informações genéticas endógenas da organela, abrindo a possibilidade de introduzir novos genes e de expressá-los a partir da sua maquinaria genética.

Sistema de Transformação de Cloroplastos

A partir de 1987, com o desenvolvimento do sistema de biolística (bom-

bardeador ou acelerador de partículas) por Sanford e colaboradores, foi criada mais uma estratégia além da *Agrobacterium* para auxiliar na introdução de DNA no compartimento nuclear das células. Essa técnica consiste em introduzir nos diversos compartimentos celulares, partículas de ouro ou de tungstênio revestidas com o DNA, em alta velocidade. O desenvolvimento da biolística trouxe um grande impulso ao desenvolvimento da tecnologia de transformação de cloroplastos pelas características físicas da organela.

As organelas, mitocôndrias e cloroplastos, possuem duas membranas, as quais constituem uma grande barreira para a introdução de genes em seus compartimentos; além disso, não são conhecidos vírus ou bactérias que possam servir de veículo na transferência de genes para o genoma das organelas. Desse modo, o sistema de biolística proporciona uma excelente ferramenta para a transformação de organelas. Apesar da introdução e expressão de diversos genes em cloroplastos de plantas estarem sendo demonstradas com sucesso desde 1990 (ver revisão Hager e Bock, 2000), e de a transformação de mitocôndrias de leveduras já ter sido relatada (Johnston et al., 1988), a introdução de genes em mitocôndrias de plantas ainda é um desafio.

O processo de introdução de um gene no genoma do cloroplasto ocorre por dois eventos de recombinação homóloga, muito bem estabelecidos pela presença de um eficiente sistema tipo-RecA herdado das cianobactérias ancestrais (Cerutti et al., 1992). Dessa forma, na construção do vetor de transformação, é imprescindível flanquear o gene de interesse contendo as seqüências regulatórias de expressão com uma seqüência de, aproximadamente, 400 pb nos dois lados da seqüência sendo introduzida no plastoma (Figura 1).

A garantia da estabilidade do transformante no cloroplasto somente é obtida a partir da presença do gene introduzido em todas as cópias do genoma da organela, o que se consegue a partir do eficiente sistema de recombinação do DNA do cloroplasto na presença de um fator de pressão seletiva. Inicialmente, em uma célula somente um ou poucos cloroplastos recebem o gene que está sendo intro-

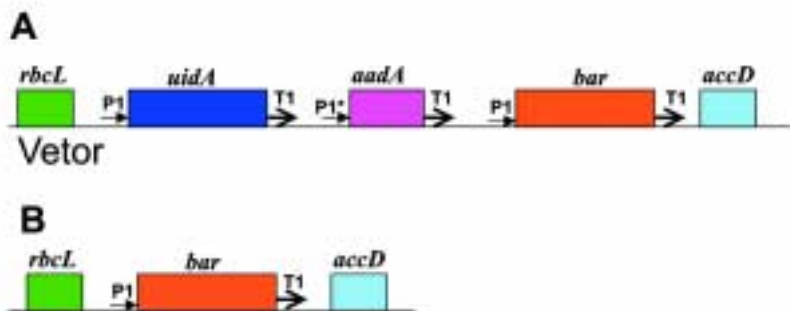


Figura 3. Eliminação do gene marcador por recombinação entre as seqüências repetitivas diretas em plantas. (A) mapa do genoma de cloroplasto transformado com um gene repórter (*uidA*), um gene marcador seletivo (*aadA*) e um gene de resistência a herbicida (*bar*). As setas P1 (□) são segmentos do promotor 16S rDNA com 174 pb; P1* são seqüências parcialmente similares a P1 e; T1 (□) são seqüências repetitivas diretas com 418 pb da região *TpsbA* regulatória. (B) A partir de múltiplos eventos de recombinação e segregação no cloroplasto, obteve-se o gene de resistência a herbicida flanqueado com uma seqüência repetitiva P1 e T1, e ausência do gene marcador e do gene repórter

duzido e, mesmo assim, esse evento não ocorre em todas as cópias do genoma. Nesse estágio, as plantas são denominadas de transplastômicas heteroplásticas, e são instáveis, podendo, na ausência da pressão de seleção, reverter à forma original não transformada. Plantas transplastômicas homoplásticas, as quais apresentam a inserção do gene introduzido em todas as cópias do genoma do cloroplasto, são obtidas por intermédio de subculturas em meio seletivo, mantendo-se a pressão de seleção. Em geral, a homoplasma ocorre após 2 a 4 subculturas.

A primeira espécie vegetal a expressar estavelmente um gene introduzido no cloroplasto foi o fumo (Svab et al., 1990, Svab e Maliga, 1993), que se tornou uma espécie modelo no desenvolvimento da tecnologia de transformação de cloroplastos de outras espécies e em estudos de expressão gênica. A transferência da tecnologia para outras espécies demorou quase 10 anos para se tornar realidade: *Arabidopsis* (Sikdar et al., 1998) e batata (Sidorov, et al., 1999) produziram transplastomas, mas resultaram plantas inférteis que somente são mantidas *in vitro*. Plantas de arroz transplastômicas heteroplásticas (Khan e Maliga, 1999) foram regeneradas, demonstrando a possibilidade de modificar a organela nesta espécie. Em 2001, Ruf e colaboradores obtiveram plantas transplastômicas férteis de tomate apre-

sentando alto nível de expressão da proteína exógena nos plastídeos demonstrando que mesmo os frutos maduros acumulam em torno de 50% dessa proteína. Essa conquista demonstra o grande potencial biotecnológico dessa tecnologia para obter plantas com alto teor nutritivo quanto à expressão de aminoácidos essenciais e de vitaminas em folhas e frutos (os nutracêuticos), como também para desenvolver vacinas comestíveis.

Genes marcadores seletivos

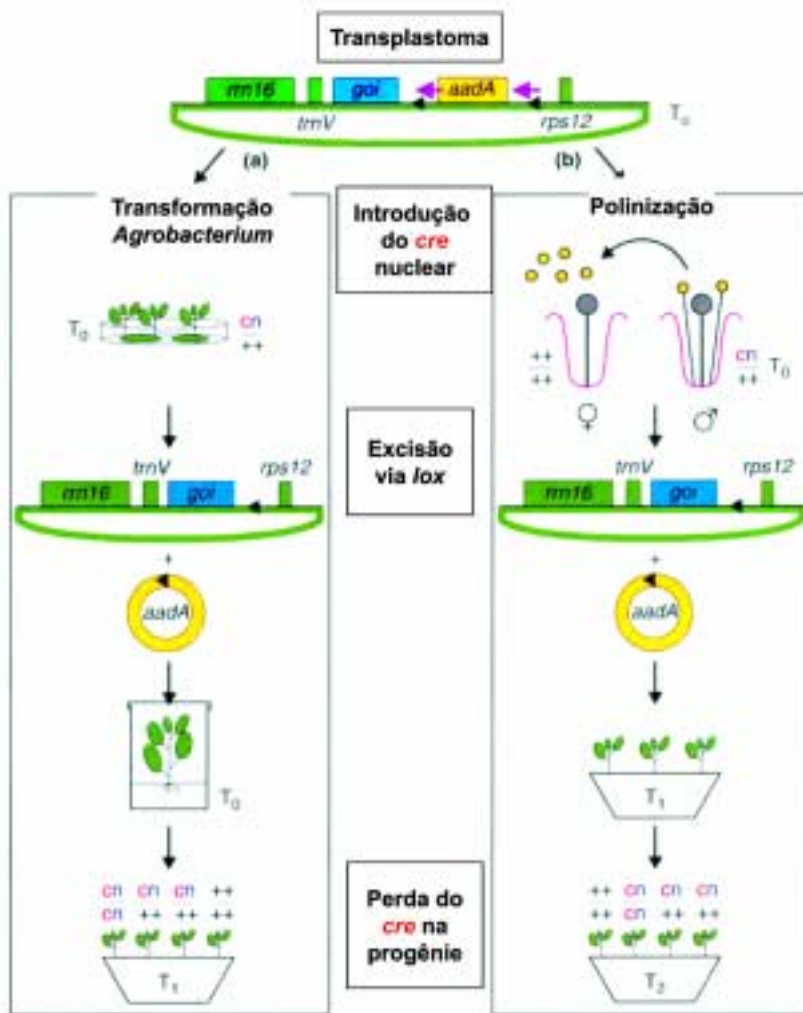
Uma grande contribuição para o sucesso da obtenção dos transformantes foi o desenvolvimento do primeiro marcador seletivo resistente a um antibiótico específico de cloroplasto, o gene bacteriano *aadA* (aminoglicosídeo 3'-adeniltransferase), que confere resistência aos antibióticos espectinomicina e estreptomomicina (Goldshmidt-Clermont, 1991). A escolha do gene marcador seletivo e o agente de seleção é bastante crítico na determinação do sucesso da transformação. O antibiótico normalmente utilizado na transformação de cloroplasto é a espectinomicina devido à sua alta especificidade como inibidor do processo traducional em procarióticos e pelo seu baixo efeito tóxico nas células de plantas (Bock, 2001). A enzima catalisa a transferência de um resíduo de AMP do ATP para a espectinomicina e converte o

antibiótico em uma forma inativa (adenil-espectinomicina), que não mais inibe a biossíntese da proteína ribossomal procariótica 70S presente no cloroplasto (Svab e Maliga, 1993). Para tornar o gene *aadA* de *E. coli* um marcador seletivo específico de cloroplasto, sua região codificadora foi fusionada aos sinais de expressão do cloroplasto: um segmento 5', que contém o Promotor, região 5' não-traduzida, e a seqüência de Shine-Dalgarno, como também um segmento da região 3' não-traduzida que é necessária para dar estabilidade ao transcrito na planta (Goldschmidt-Clermont, 1991).

Genes marcadores seletivos que conferem resistência a outros antibióticos como canamicina (Carrer et al., 1993), gentamicina, lincomicina e genes de resistência a herbicidas, *bar* (Lutz et al., 2001) e *als* (Carrer e Maliga, não publicado) não apresentaram possibilidade de selecionar plantas transplastômicas. Recentemente, foi descrito por Daniell et al., 2001, um novo marcador seletivo que confere resistência a betaina aldeído desidrogenase, cujo gene se encontra no núcleo de algumas espécies vegetais, como o espinafre. Esse gene tem demonstrado ser uma excelente alternativa para o uso de genes de resistência a antibióticos para plantas que não apresentam esse gene endógeno. Para estudos de expressão gênica dos genes plastidiais regulados por genes nucleares, foi desenvolvido um marcador seletivo negativo, o gene *codA*, de *E. coli*, que expressa citosina deaminase e é letal para a célula na presença de 5-fluorcitosina quando esta é aplicada exogenamente no meio de cultura (Serino e Maliga, 1997). Também, genes repórteres como *uidA* e *gfp*, que codificam para a proteína GUS e verde fluorescente, respectivamente, têm auxiliado nos estudos de expressão gênica e no desenvolvimento da tecnologia de transformação de cloroplastos em diferentes espécies vegetais (Khan e Maliga, 1999; Bogorad, 2000; Bock, 2001; Maliga, 2002).

Métodos de eliminação do Gene Marcador Seletivo

Até o presente, em sua grande maioria, os genes introduzidos no genoma cloroplastidial são ligados ao gene



Cópia da Publicação: Current Opinion in Plant Biology 2002, 164-172; Pal Maliga, Engineering the plastid genome of higher plants. Copyright 2002, com permissão de Elsevier Science.

Figura 4. Esquema do processo de eliminação do gene marcador pelo sistema de recombinação específica CRE-lox. Neste exemplo, o cloroplasto transformado possui o gene marcador *aadA* flanqueado pelas seqüências *lox* (setas rosas flanqueando o gene *aadA*). O gene de interesse (*gor* - retângulo azul) foi introduzido selecionando-se as plantas transplastômicas pelo gene marcador. (A) introdução do *cre* por transformação nuclear com *agrobacterium* ou (B) por polinização de uma planta transgênica resultam na expressão da proteína recombinase CRE sítio-específica a partir do gene nuclear *cre*. A proteína CRE é dirigida ao cloroplasto, onde se expressa e, simultaneamente, remove o gene marcador de todas as cópias do genoma cloroplastidial que possui a seqüência *lox*. A presença de *cre* e do gene marcador seletivo *neo*, que confere resistência à canamicina no núcleo, esta representada por (c) e (n), respectivamente; a ausência desses genes estão representadas por (+). Plantas transformadas regeneradas em cultura de tecidos estão representadas por (T_0); Primeira e segunda geração da progênie produzidas por auto-polinização da T_0 estão representadas por T_1 e T_2 , respectivamente

marcador seletivo *aadA*, sendo ambos integrados ao genoma da organela (Figura 1). Devido ao fato desse genoma ser poliplóide, pode-se ter a presença

de até 10.000 cópias do gene marcador seletivo com alto nível de expressão dessa proteína nas células das plantas transplastômicas. Esta proteína não

tem utilidade nas células vegetais e apresenta uma preocupação constante diante da possibilidade dos genes de resistência a antibióticos poderem ser transferidos para plantas daninhas, microrganismos do solo e para o trato digestivo de animais e pessoas (Daniell et al., 2001). Em muitos países, a presença de genes de resistência a antibióticos impede a liberação de transgênicos para uso comercial.

Visando a contornar essas preocupações, estão sendo desenvolvidas algumas estratégias para eliminar o gene marcador seletivo de plantas transgênicas nucleares, como descrito na revisão de Ow e Medberry, 1995. Em cloroplastos, algumas características da própria organela, tais como alta frequência de recombinação no DNA do genoma das organelas e o uso de um sistema de recombinação de bacteriófagos Cre-lox estão sendo utilizadas como estratégias na excisão do gene marcador seletivo.

Em *Chlamydomonas reinhardtii*, foi demonstrado por Fischer et al., em 1996, duas importantes estratégias para eliminar e, então, poder reutilizar o gene marcador seletivo *aadA* na transformação de cloroplastos. Uma dessas estratégias demonstrou que duas seqüências repetitivas diretas, contendo cerca de 483 bp flanqueando o gene a ser eliminado, resultou na excisão do gene marcador por "loop-out" (Figura 2). Foi apresentado no trabalho que transformantes homoplásmicos em meio seletivo mantiveram-se homoplásmicos para o gene introduzido, mesmo após terem sido transferidos para meio sem o antibiótico. Testes com seqüências de 100 e 230 bp não resultaram em deleção do gene marcador. As linhagens resultantes mantiveram uma das cópias da seqüência repetitiva após eliminação do gene seletivo, a qual permanece no genoma da organela. Esse não é um resultado muito atrativo quando se deseja introduzir vários genes de interesse, pois poderá haver um acúmulo de seqüências curtas, sem função, no genoma da organela.

Outra estratégia muito interessante testada em *Chlamydomonas* explora o fato de que o genoma do cloroplasto possui vários genes que são essenciais para a viabilidade celular. Assim, a cotransformação de um gene de inte-

resse juntamente com o gene marcador *aadA* insere ambos os genes no genoma do cloroplasto. Entretanto, o gene marcador seletivo é dirigido para ser inserido em um dos genes essenciais da organela interrompendo a função desse gene. Dessa forma, as células permanecem continuamente heteroplásmicas para o gene marcador seletivo, permitindo que o gene de interesse apresente-se homoplásmico no local de inserção, que é necessariamente uma região intergênica, para não interferir com os genes endógenos da organela. Após retirada a pressão de seleção do antibiótico (espectinomomicina) do meio seletivo, o gene *aadA* é eliminado por recombinação, restabelecendo a função do gene essencial, enquanto o gene de interesse é mantido estável por estar na forma homoplásmica. Essas estratégias vêm sendo testadas em plantas, e desde que a cotransformação mostrou-se um eficiente método para inserção de mais de um gene, simultaneamente, no genoma de cloroplasto de fumo (Carrer e Maliga, 1995), acreditamos que essa seja uma elegante estratégia para obtenção de plantas transplastômicas sem o gene marcador seletivo.

Experimentos de eliminação do gene marcador em cloroplastos de plantas vêm sendo objeto de estudo em vários laboratórios de pesquisa no mundo. Trabalhando com fumo, Iamtham e Day, 2000, expressaram simultaneamente três genes, *aadA*, *uidA* e *bar*, em cloroplastos, utilizando um vetor de transformação específico. Esse vetor possui o promotor 16S rRNA (*rrn*) fusionado a região 5' codificadora dos três genes, produzindo uma sequência repetitiva direta de 174 pb. A sequência regulatória *TpsbA* foi clonada na região 3' desses genes criando sequências repetitivas diretas de 418 pb. Os genes foram introduzidos no genoma do cloroplasto na região inter-específica entre os genes *rbcl* e *accD* (Figura 3). Após a obtenção de plantas transplastômicas, em meio seletivo contendo o antibiótico espectinomomicina, as brotações verdes foram transferidas para meio contendo glifosinato, um herbicida onde tecidos expressando o gene *bar* regeneraram plantas. Inicialmente foi obtida a inserção dos três genes e, após retirada do antibiótico e do herbicida, as plantas foram transfe-

ridas para meio sem nenhuma pressão de seleção. Foram observados vários eventos de recombinação e de perda de alguns genes por "loop-out", que resultaram em plantas transplastômicas apresentando linhagens com: a) ausência do gene *aadA* e *bar*; 2) ausência dos genes *aadA* e *uidA*; c) ausência do gene *aadA*; e d) ausência do gene *bar*. Essa estratégia apresentou resultados de grande interesse na eliminação do gene marcador, observando-se, contudo, a presença de uma cópia da região repetitiva introduzida ligada ao gene de interesse inserido.

Uma outra estratégia para eliminar o gene marcador de cloroplastos de plantas (Figura 4) utiliza o sistema de recombinação do bacteriófago P1 CRE-lox (Hoess e Abremski, 1990). Esse processo foi utilizado em cloroplastos independentemente por Corneille et al., 2001, e por Hajdukiewicz et al., 2001, que demonstraram o grande potencial dessa metodologia para eliminar genes de resistência ao antibiótico *aadA*. CRE é uma enzima recombinase de fago sítio-específica que remove qualquer segmento de DNA entre duas sequências repetitivas e diretamente orientadas de 34 bp denominadas de sítios-lox. No vetor de transformação do cloroplasto, as sequências lox devem flanquear o gene marcador que está ligado ao gene de interesse. Dessa forma, os genes são introduzidos no genoma do cloroplasto na ausência da proteína CRE, até que as plantas transplastômicas tornem-se homoplásmicas. Uma das estratégias para dirigir a proteína CRE no cloroplasto, é através de transformação de plantas transplastômicas por *Agrobacterium tumefaciens*, introduzindo no núcleo o gene *cre* ligado a uma sequência peptídeo sinal de direcionamento da proteína ao cloroplasto onde é ativa (Hajdukiewicz et al., 2001). O gene *cre* é subsequente removido por segregação na progênie. Outra estratégia alternativa, demonstrada por Corneille et al., 2001, utiliza a processo de fertilização das plantas transplastômicas com pólen de plantas transgênicas nuclear expressando a proteína CRE com peptídeo sinal de direcionamento ao cloroplasto. A obtenção de plantas com ausência do gene marcador seletivo ocorre já na primeira geração de sementes, sen-

do um processo muito ativo de recombinação, dirigida pelo sistema CRE-lox. O sistema de polinização apresentou algumas vantagens quando comparado com o sistema de clones transformados por *Agrobacterium* pela ausência de possíveis rearranjos não previsíveis que ocorrem nesse método. O sistema CRE-lox demonstrou ser uma eficiente metodologia para eliminar o gene marcador seletivo, principalmente por não deixar no genoma nenhuma sequência resultante da introdução do sítio-lox, em contraste com a metodologia loop-out onde uma das sequências repetitivas permanece no genoma da organela e um grande número de plantas precisam ser analisadas para selecionar as plantas sem o gene marcador seletivo.

Perspectivas Futuras

Transformação de cloroplastos é uma tecnologia com grandes atrativos para o desenvolvimento de processos biotecnológicos na agricultura e para a produção de nutracêuticos. São várias as vantagens de expressar genes em cloroplastos comparando-se com a tecnologia de transformação nuclear: a localização do transgene no genoma é dirigida pelo sistema de recombinação homóloga; não apresenta silenciamento de genes; por ser um sistema poliploide apresenta grande acúmulo de proteína solúvel total nas células e; principalmente, pela organela apresentar herança maternal na maioria das plantas cultivadas, a transferência dos transgenes para espécies aparentadas via pólen, não ocorre.

As possíveis desvantagens do sistema de transformação de cloroplastos consistem na falta de um sistema de exportação de proteínas do cloroplasto para o citoplasma ou outro compartimento celular e na falta de proteínas específicas (chaperonas) necessárias para alguns processos pós-traducionais de montagem estrutural ou de modificação de algumas proteínas para sua atividade celular, como glicosilação, fosforilação, e outros. Esses processos precisam ser melhor entendidos na organela e na interação com o núcleo para poder contornar essas dificuldades.

Quanto a preocupação existente sobre a utilização de genes marcadores

de resistência a antibióticos, resultando no grande número de cópias nas plantas transplastômicas, já há alguns anos está sendo estudado em vários laboratórios de pesquisa. Neste artigo, está sendo apresentado o grande potencial de algumas estratégias de remoção desses genes do genoma do cloroplasto.

Até o presente, poucas espécies vegetais apresentaram sucesso na transformação de cloroplastos. A partir do conhecimento adquirido com tabaco, tomate e *Arabidopsis* será possível obter maior abrangência dessa tecnologia para outras espécies. Pesquisas serão dirigidas para o desenvolvimento de novos vetores de transformação contendo as seqüências regulatórias para produção de alta expressão de proteína em tecidos específicos juntamente com um conveniente processo de eliminação do gene marcador seletivo. Será também desejável a introdução de múltiplos genes para a expressão simultânea de várias características, visando a atender às necessidades de um aumento da produtividade agrícola e melhoramento nutricional dos alimentos. Para isso, o cloroplasto seria o compartimento celular apropriado para a expressão simultânea desses múltiplos genes.

Bibliografia citada:

Bendich, A.J. (1987). Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome. **BioEssays**, 6, 279-282.

Bock, R. (2001). Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. **J. Mol. Biol.** 312, 425-438.

Bogorad, L. (2000). Engineering chloroplasts: na alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. **Trends Biotechnol.** 18, 257-263.

Boyton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jone, A.R., et al. (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. **Science**, 240, 1534-1538.

Carrer, H. e Maliga, P. (1995). Targeted insertion of foreign genes into the tobacco plastid genome without physical linkage to the selectable marker gene. **Bio/Technology**

gy 13, 791-794.

Carrer, H., Hockenberry, T.N., Svab, Z., Maliga, P. (1993). Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. **Mol. Gen. Genet.** 241, 49-56.

Cerutti, H., Osman, M., Grandoni, P., Jagendorf, A.T. (1992). A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89, 8086-8072.

Coleman, A.W. e Nerozzi, A.M. (1999). Temporal and spatial coordination of cells with their plastid component. **Int. Rev. Cytol.** 193, 125-164.

Corneille, S., Lutz, K., Svab, Z., Maliga, P. (2001). Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the *Cre-lox* site-specific recombination system. **Plant J.** 27, 171-178.

Daniell, H., Wiebe, P.O., Millan, A.F.S. (2001). Antibiotic-free chloroplast genetic engineering – na environmentally friendly approach. **Plant Science**, 6, 237-239.

Fischer, N., Stampacchia, O., Redding, K. and Rochaix, J.D. (1996). Selectable marker recycling in the chloroplast. **Mol. Gen. Genet.** 251, 373-380.

Goldschmidt-Clermont, M. (1991). Transgenic expression of aminoglycoside adenyl transferase in the chloroplast: a selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. **Nucl. Acids. Res.** 19, 4083-4089.

Goldschmidt-Clermont, M. (1998). Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. **Int. Rev. Cytol.** 177, 115-180.

Hager, M e Bock, R. (2000). Enslaved bacteria as new hope for plant biotechnologists. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 54, 302-310.

Hajdukiewicz, P.T.J., Gilbertson, L. and Staub, J.M. (2001). Multiple pathways for *Cre/lox*-mediated recombination in plastids. **Plant J.** 27, 161-170.

Hoess, R. and Abremski, K. (1990). The *Cre-lox* recombination system. In **Nucleic Acids and Molecular Biology** (Eckstein, F. and Lilley, D.M.J., eds). Berlin: Springer-Verlag. 99-109.

Iamtham, S. e Day, A. (2000). Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. **Nature Biotechnol.** 18, 1172-1176.

Johnston, S.A., Anziano, P.Q., Shark, K., Sanford, J.C. & Butow, R.A. (1988). Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. **Science**, 240, 1538-1541.

Khan, M.S. e Maliga, P. (1999). Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. **Nature Biotechnol.** 17, 910-915.

Lutz, K.A., Knapp, J.E., Maliga, P. (2001). Expression of *bar* in the plastid genome confers herbicide resistance. **Plant Physiol.** 1251, 1585-1590.

Maliga, P. (2002). Engineering the plastid genome of higher plants. **Current Opinion in Plant Biology** 5, 164-172.

Ow, D.W. e Medberry, S.L. (1995). Genome manipulation through site-specific recombination. **Crit. Rev. Plant Sci.** 14, 239-261.

Ruf, S., Hermann, M., Berger, U., Carrer, H., Bock, R. (2001). Stable genetic transformation of tomato plastids: foreign protein expression in fruit. **Nat. Biotechnol.** 19, 870-875.

Sanford, J.c., Klein, T.M., Wolf, E.D., Allen, N (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Part. Sci. Technol.** 5, 27-37.

Serino, G., Maliga, P. (1997). A negative selection scheme based on the expression of cytosine deaminase in plastids. **Plant J.** 12, 697-701.

Sidorov, V.A., Kasten, D., Pang, S.Z., Hajdukiewicz, P.T.J., Staub, J.M, Nehra, N.S. (1999). Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. **Plant J.** 19, 209-216.

Sikdar, S.R., Serino, G., Chaudhuri, S., Maliga, P. (1998). Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Rep.** 18, 20-24.

Svab, Z., Hajdukiewicz, P., Maliga, P. (1990). Stable transformation of plastids in higher plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87, 8526-8530.

Svab, Z. e Maliga, P. (1993). High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90, 913-917.