

# 植物质体基因工程：新的优化策略及应用

周菲，路史展，高亮，张娟娟，林拥军

华中农业大学，作物遗传改良国家重点实验室，武汉 430070

**摘要：**植物质体转化技术通过同源重组实现定点整合，与细胞核基因工程相比，使外源基因表达更为精确、安全和高效率。该技术在基础研究中为叶绿体功能基因组研究提供了有效手段，同时也在应用方面为外源基因表达提供了理想的平台，已成为植物遗传育种的一种新策略。本文总结了近年来质体基因工程在转化体系的建立和优化上的新思路，着重阐述了利用质体转化技术在遗传育种中提高作物抗性、改良品质等应用领域的最新研究进展。克服质体转化技术在作物遗传育种中面临的难题，必将为作物育种的发展带来新的绿色革命。

**关键词：**质体基因工程；表达调控元件；遗传育种

## Plastid genome engineering: novel optimization strategies and applications

Fei Zhou, Shizhan Lu, Liang Gao, Juanjuan Zhang, Yongjun Lin

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** The plastid genome engineering system allows site-specific modifications *via* two homologous recombination events. It is much safer, more precise and efficient compared with the nuclear transformation system. This technology can be applied to the basic research to expand plastid genome function analysis, and it also provides an excellent platform for not only high-level production of recombinant proteins but also plant breeding. In this review, we summarize the state of the art and progresses in this field. We focus on novel breeding strategies in transformation system improvement and new tools to enhance plastid transgene expression levels. In addition, we highlight selected applications in resistance engineering and quality improvement *via* metabolic engineering. We believe that by overcoming current technological limitations in the plastid transformation system can another green revolution for crop breeding beckon.

**Keywords:** plastid genome engineering system; expression regulation element; genetic breeding

根据真核生物进化的内共生学说，植物质体在进化上源于蓝细菌，但在漫长的进化过程中，其大部分基因已转移到核基因组中<sup>[1,2]</sup>。质体作为自主遗传

信息的重要细胞器，与核基因组和线粒体基因组相比，质体基因组是基因密度最大的，在 120~210 kb 的基因组中含有 100 多个基因。根据功能，质体基

收稿日期：2015-01-06；修回日期：2015-04-12

基金项目：国家自然科学基金青年项目(编号：31100945)和校自主科技创新基金项目(编号：2012ZYT056)资助

作者简介：周菲，博士，副教授，研究方向：质体生物学及生物技术。E-mail: zhoufei@mail.hzau.edu.cn

通讯作者：林拥军，博士，教授，研究方向：转基因抗虫水稻培育。E-mail: yongjunlin@mail.hzau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-018

网络出版时间：2015-6-16 10:46:34

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150616.1046.001.html>

因主要分为 3 类：(1)光合作用相关基因；(2)负责转录和翻译的相关基因；(3)其他功能相关的基因和开放阅读框(如：*ycf* 基因)<sup>[3,4]</sup>。真核生物首次实现质体遗传转化是在单细胞生物衣藻中<sup>[5]</sup>。1990 年，Svab 等<sup>[6]</sup>报道了在烟草(*Nicotiana tabacum* L.)中的首例质体转化，标志着高等植物质体基因工程的开始。

质体转化技术基于同源重组原理，能够实现目的基因的靶向敲除(图 1)，因此该技术在反向遗传学研究中得到了充分的利用。通过分析突变体的表型，以是否能够进行光合自养作为标准，已发现 *petA*、*petB*、*petD*、*psaA*、*psbA*、*psbE*、*psbF*、*psbL*、*psbJ*、*rbcL*、*ycf3*、*ycf5* 和 *ycf6* 等为功能必需基因，而大部分 *ndh* 家族基因则为非必需基因<sup>[7]</sup>；以是否参与转录和翻译为标准，在核糖体蛋白编码基因中发现 *rpl20*、*rpl22*、*rpl23*、*rpl32*、*rps2*、*rps3*、*rps4*、*rps14*、*rps16* 和 *rps18* 为必需基因，*rpl33* 为非必需基因，但是 *rpl33* 在低温环境下能够起到保证质体翻译效率的作用<sup>[8-11]</sup>。利用质体转化技术还能对调控元件进行精细研究。例如：通过置换 *rbcL* 蛋白中的部分氨基酸，研究核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶(RuBisCO)行使蛋白功能的重要氨基酸序列<sup>[12]</sup>；通过定点移除 *ycf3* 的内含子 1 和内含子 2，研究质体基因中的 II 型内含子的剪切特性和功能<sup>[13]</sup>；通过改变特异位点碱基，研究 RNA 编辑位点功能<sup>[14]</sup>等。

在高效表达外源基因方面，质体基因工程具有独特的优越性和广阔的应用前景：(1)转化手段简单；(2)植物细胞中含有高拷贝叶绿体基因组(每个叶片细胞中可高达 10 000 个拷贝)，能够保证外源蛋白高效表达，易纯化；(3)原核生物基因无需修饰改造就能直接表达；(4)利用同源重组系统确保定点插入(图 1)，可以避免核转化中可能发生的位置效应和基因沉默；(5)由于大部分高等植物叶绿体的母系遗传特性，达到同质化的转化植株的后代将永远保持纯系，同时外源基因不会随花粉扩散而造成环境安全问题<sup>[15-18]</sup>。从 1990 年至今，质体基因工程的优势已逐渐被人们认识并应用，已报道的成功转化物种近 20 种<sup>[15,19]</sup>。在生物医药应用上以叶绿体作为生物反应器高效表达了 40 多种外源蛋白，包括多种抗体和疫苗<sup>[20-29]</sup>。近年来，利用质体转化系统开发口服性疫苗方面有了显著的进展，其优势在于：(1)植物细胞壁可以保护外源蛋白不被胃酸破坏的优势，使目的蛋白能够

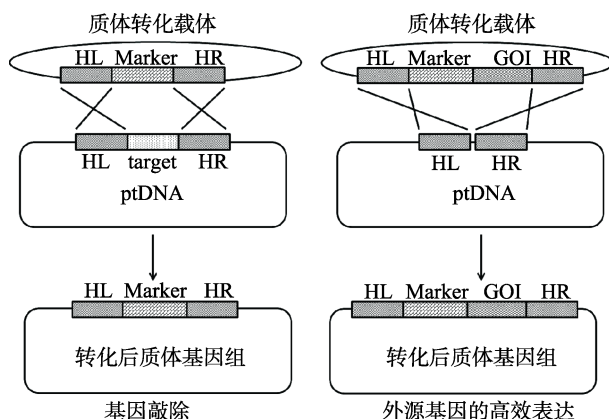


图 1 利用同源重组实现目的基因敲除和外源基因的高效表达示意图

质体转化载体上具有插入位点左右两端的同源片段(HL 和 HR)，利用筛选标记基因(Marker)，通过两次同源片段的重组事件，能够定点置换质体基因组(ptDNA)中目的基因(Target)，从而实现目的基因的敲除；同时也能够定点插入目的基因(GOI)。

进入消化道；(2)利用霍乱毒素 B 亚单位(CTB)将蛋白质定向在免疫系统。CTB 是一种免疫佐剂，在人体的肠道内作为受体具有高亲和力，将目的蛋白与 CTB 融合可以帮助其被体内吸收，借助专门的免疫系统细胞，诱导免疫耐受<sup>[30]</sup>。例如：利用烟草叶绿体高效表达血管紧张素转换酶(ACE2)和血管紧张素 1-7 (Ang 1-7)喂食小鼠能够显著抑制葡萄膜炎和自身免疫性葡萄膜视网膜炎的发生<sup>[31,32]</sup>；喂食烟草质体表达凝血因子 FVIII 抗原能够抑制患血友病 A 的小鼠体内辅助性 T 细胞的反应和抑制凝血因子 FVIII 拮抗的形成<sup>[33,34]</sup>。在作物改良方面，围绕提高抗逆性(包括病虫害等生物逆境与干旱、盐碱等非生物逆境)、改良品质和提高产量等目标进行了大量的探索<sup>[19,35,36]</sup>。本文总结了近 5 年来质体基因工程在转基因育种体系、调控元件优化方面的新思路和新策略，并重点阐述了农艺性状改良中抗生物逆境和利用代谢途径改良品质方面的最新进展。

## 1 质体基因工程的育种新系统

### 1.1 新型质体转化筛选系统

植物质体基因工程整合目的基因的原理：通过同源重组双交换的模式将目的基因插入到质体基因组的特定位点中，稳定整合的目的基因在细胞分裂时可以复制并进入到新分裂出的细胞中。但在转化筛选初期插入了目的基因的叶绿体基因组只占较少

的比例, 为了达到同质化, 合适的筛选标记基因和再生条件是必要的(图 2)。目前, 在双子叶植物的质体转化中通常使用的筛选标记基因是抗生素抗性基因, 包括 *aadA* 基因(编码氨基糖苷-3'-腺苷酸转移酶, 具有壮观霉素和链霉素抗性)<sup>[37,38]</sup>、*npt II* 基因(编码新霉素磷酸转移酶, 具卡那霉素抗性)<sup>[39]</sup>和 *aphA-6* 基因(编码氨基糖苷磷酸转移酶, 具卡那霉素抗性)<sup>[40]</sup>。壮观霉素由于其高度的特异性和对植物细胞的无毒副作用成为双子叶植物质体转化中常用的筛选试剂, 因此 *aadA* 基因在双子叶植物的质体转化最常使用。最近研究表明, *cat* 基因(编码氯霉素乙酰转移酶, 具有氯霉素抗性)也可以作为质体转化的筛选标记基因<sup>[41]</sup>。

由于消费者对于遗传工程生物可能带来的环境安全和食品安全问题的顾虑, 在转基因育种中开发和运用非抗生素类筛选标记基因成为研究者们关注的热点。近年来, 代谢途径中的相关基因, 如 *ASA2* 基因<sup>[42]</sup>和 *dao1* 基因<sup>[43]</sup>都成功用于烟草的叶绿体转化筛选系统。*ASA2* 基因编码邻氨基苯甲酸合成酶(AS)的  $\alpha$  亚基, 具有对吡啶类似物 4-甲基吡啶(4MT)和色氨酸类似物 7-甲基-DL-色氨酸(7MT)抗性; *dao1*

基因编码 D-氨基酸氧化酶(DAAO), 利用不同 D-型氨基酸对植物细胞的不同毒性以及通过 DAAO 酶催化后代谢产物的毒性转化, *dao1* 既可用于正筛选系统, 也可以用于负筛选系统。另一方面, 研究者也积极发展筛选基因删除技术。例如, 近年来发展起来的直接重复序列介导的删除系统<sup>[44]</sup>、转座酶介导的删除系统, 以及位点特异性重组删除系统——Cre/Lox 系统<sup>[45]</sup>、*phiC31/att*<sup>[46,47]</sup>系统和 *Bxb1/att* 系统<sup>[48]</sup>。

## 1.2 质体基因组和核基因组共转化系统

外源 DNA 进入叶绿体首先需要穿过细胞壁、原生质体膜及叶绿体双层膜, 目前质体转化的方法主要是 PEG 法和基因枪法。PEG 法作用于没有细胞壁的原生质体, 不需要昂贵的基因枪, 在烟草的转化体系中能够从 106 个原生质体中获得 20~50 个质体转化事件, 在西红柿(*Solanum lycopersicum*)<sup>[51]</sup>、生菜(*Lactuca sativa*)<sup>[52]</sup>中也有报道, 但该体系中原生质体的分离与培养难度大<sup>[53]</sup>。与之相比, 基因枪法转化效率高且安全性好, 目前报道的质体转化方法多利用基因枪法。随着育种研究的深入, 为实现对植物代谢途径的精细调控, 就需要对核基因和质体基

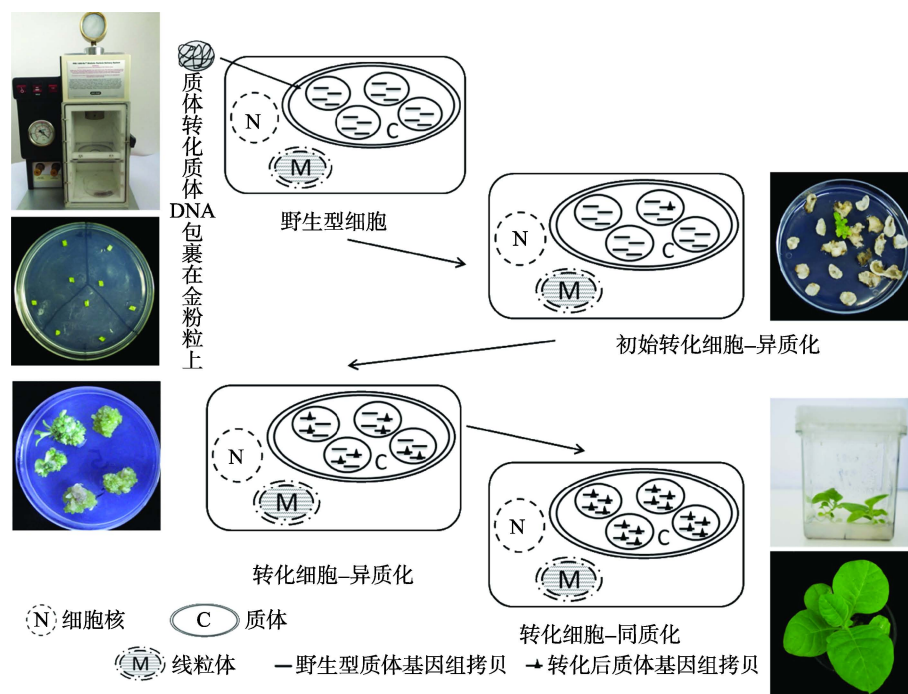


图 2 质体转化和筛选同质化植株过程示意图(参考文献[49,50]并修改)

利用基因枪将携带 DNA 质粒的金粉轰击到转化受体细胞中。通过 2~3 轮的筛选, 使转化细胞中所有的质体基因组拷贝都成为转化型, 达到同质化后, 放入小方盒在生根培养基上生根后, 转入土壤中在温室培养。



因进行同步调控。2011 年, Elghabi 等<sup>[54]</sup>利用核转化特异质粒 pNKY 与质体转化特异质粒 pPSG 实现了一步完成核基因组与质体基因组的共转化, 从而能够极大地缩短育种周期。通过比较两种质粒不同混合方式, 该研究明确了: (1) 为提高共转化效率, 两种不同质粒需要由同一个金粉粒携带(即操作中应先混合质粒 DNA, 再进行金粉粒包裹); (2) 两个金粉粒同时进入一个细胞的可能性非常小, 因为携带不同质粒 DNA 的金粉粒混合后再进行转化, 未得到共转化事件; 这也揭示了基因枪介导质体转化机制中的一个基本事实: 即质体同质化状态并不是由于多个金粉粒进入同一个细胞中造成多个质体转化而实现的。

### 1.3 质体转移育种的新理念: 利用质体基因组细胞间转移

近年来, 质体基因工程发展迅速, 取得了很大进展, 已在超过 16 种植物中成功获得质体转基因植株。但体系稳定且效率高的仍只有茄科植物烟草。西红柿的质体转化体系目前仅在 IPA-6、Dorothy's Green 和 Green Pineapple 等 3 个品种中建立<sup>[55]</sup>。如何提高转化效率、扩大可转化物种范围, 除了建立和优化靶标品种的组培、转化体系, 亦需要发展新型育种理念。2009 年, Stegemann 等<sup>[56]</sup>的研究表明, 通过简单的嫁接技术就能够实现质体基因组大片段、乃至整个质体基因组在同一物种的细胞间发生转移。2012 年, Stegemann 等<sup>[57]</sup>进一步表明通过嫁接, 在一定的筛选压力下, 完整的质体基因组能够实现在两个种间不亲和的茄科植物, 木质茎的品种 *N. glauca* 和草质茎的本氏烟草 *N. benthamiana* 之间的转移。2014 年, Fuentes 等<sup>[58]</sup>的研究证明通过嫁接和筛选, 核基因组也可以通过细胞间转移, 利用两个原本种间不亲和的茄科植物, 能够培育可育的新型的异源多倍体品种。这一系列研究为作物育种提供了新理念——通过嫁接技术, 利用质体基因组、核基因组在细胞间的水平转移, 可以打破种间隔离, 进而产生新的物种<sup>[15]</sup>。

## 2 质体基因工程的新型表达调控元件

为了实现目的基因的高效表达, 需要利用质体特异的具有高效转录、翻译能力的调控元件, 相对

于质体发育和分化的研究, 叶绿体中高效表达元件的探索较为深入<sup>[59]</sup>。16S rRNA 操纵子的启动子 *Prrn* 以及受光调控的 *psbA* 基因的启动子 *PpsbA* 能够驱动目的基因的高效转录, 两者已被广泛运用在叶绿体转化载体中。为保证转录的 mRNA 的稳定性, 避免其被外切核酸酶降解, 在质体基因表达中 3'UTR 通常具有稳定的茎环二级结构<sup>[60]</sup>; 另外, 由于质体基因表达受转录后调控, 5'UTR 和核糖体结合位点(SD 序列)对于保障外源蛋白的表达效率尤为重要, 目前使用广泛的是噬菌体 T7 基因 10 表达序列 T7g10<sup>[61]</sup>和人工合成的 18 bp 包含核糖体结合位点的 *rbcl* 5'UTR<sup>[62]</sup>。新分离出的表达序列 T7g1.3、T4g23 和 T7g10 同样能够保证目的蛋白表达, 但其效率比 T7g10 低<sup>[63]</sup>。在起始密码子后面加入不同的下游表达元件(Downstream box, DB)也能够使目的蛋白的表达量显著改变<sup>[64]</sup>。在众多的表达调控元件组合中, *Prrn* 启动子与表达序列 T7g10 的组合能够保障目的基因表达, 故使用频率较高。在质体转化系统建立和使用的初期, 使用的表达调控元件多为物种内源的, 但为了避免内源片段之间发生非预期的同源重组<sup>[65,66]</sup>, 近年来研究者们也在有意识地利用一些异源片段。例如, 在烟草质体转化载体中运用玉米来源的启动子 *ZmPrrn* 和 *ZmPclpP*<sup>[67]</sup>、衣藻来源的终止子 *crTrbcL*<sup>[55]</sup>、*E. coli* 来源的终止子 *Tint*、λ 噬菌体来源的终止子 *Trho*<sup>[68]</sup>。为了灵活使用不同的表达调控元件、简化转化载体的构建, 研究者们还设计了以 Gateway 重组系统为基础的转化载体<sup>[69]</sup>。但是, 在质体转化系统中, 如何在转录翻译效率高的基础上保证蛋白的稳定、实现目的基因的特异时空表达, 利用多基因共同表达调控复杂的代谢途径呢? 针对这些问题, 研究者们正在采用多种策略, 积极开发新的表达调控元件和系统(图 3)。

### 2.1 蛋白表达稳定元件

在质体表达系统中, 外源蛋白表达量主要受两个因素调控: 基因的转录翻译效率和蛋白稳定性。在叶绿体转化系统中已有很多成功报道, 外源蛋白的表达量甚至可以达到可溶性总蛋白的 70%<sup>[70]</sup>。但是细胞中蛋白质稳定性受多种因素控制, 在同样的表达调控体系下, 不同外源蛋白的表达量可能相差很大, 一般来说, 小分子量蛋白的表达效率低。

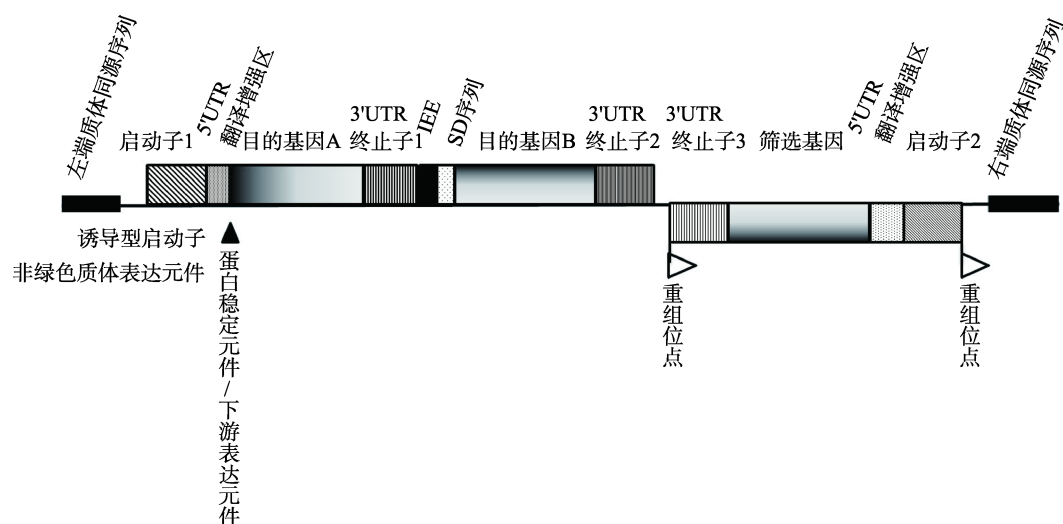


图 3 质体转化载体结构示意图

左右两边水平黑色实心方框表示左右两侧质体同源序列，用于目的片段的定向插入；斜线填充的方框表示启动子区域；圆点填充的方框表示 5'UTR 区；竖线填充的方框表示 3'UTR 区域；同一类型但不同填充程度的方框表示选用元件为不同来源。启动子可选用诱导型启动子或质体分化特异阶段表达元件，调控目的基因的时空表达。实心三角形表示目的基因在起始密码子后可携带蛋白稳定元件或下游表达元件。利用 IEE 元件表达多基因时，目的基因 B 前面应带有 SD 序列。筛选标记基因表达盒两边可加重重组位点或重复序列(空心三角形示意)，获得同质化植株后，可以利用重组系统进行筛选标记基因的去除。

根据 N 端效应，在原核生物和真核生物中蛋白质的半衰期都与多肽链 N 端特异的氨基酸有关，但在不同生物中，N 端氨基酸的性质对稳定性的效力不一样<sup>[71]</sup>。2010 年 Apel 等<sup>[72]</sup>利用质体转化系统首次研究了 N 端氨基酸对质体蛋白质稳定性的影响，通过改变外源重组 GFP 蛋白序列中 N 端的第 2 位氨基酸残基，发现 Cys、His、Asp 和 Ile 为不稳定的氨基酸残基，而 Glu、Met 和 Val 可以起到稳定表达的作用。

质体中蛋白质稳定性不仅取决于蛋白质 N 端第二位残基，同时也受 N 端、C 端区域多肽的整体影响。而且相对于 C 端蛋白质残基而言，质体蛋白质 N 端对蛋白质的稳定性影响更大<sup>[72]</sup>。更深入的研究表明，对于小于 15 kDa 的小分子量蛋白，在其 N 端仅需增加 10 个氨基酸的短肽就足以起到稳定蛋白的作用<sup>[73]</sup>。

## 2.2 诱导调控系统

质体表达系统在实现目的基因高效表达的同时，也有可能因某些蛋白的组成型高效表达而对植物造成明显的负面效应，对植物的生长和发育造成代谢负担<sup>[74]</sup>。在这种情况下，可以采取在特定的时间打开或是关闭特定基因的表达策略。例如采用诱导型表达策略调控外源基因在特定生长发育时期表达，以减

轻外源蛋白的大量表达而对植物本身造成的负效应。

在质体转化系统中首例成功报道的诱导系统是一个双重系统：(1)将与噬菌体 T7 启动子融合的目的基因通过基因枪转化定点整合到质体基因组中；(2)将融合了质体定位信号的由乙醇诱导型启动子驱动的 T7 聚合酶基因转化到核基因组中。该系统利用乙醇诱导表达带有信号肽的 T7 聚合酶，进而调控质体中转化的目的基因的转录起始<sup>[75]</sup>，但是该系统操作复杂。另一个诱导系统是在质体中直接利用 IPTG-lac 体系<sup>[76]</sup>，外源 *gfp* 基因受 Lac 操纵子驱动，在非诱导条件下，Lac 操纵子处于遏制状态，抑制外源基因 *gfp* 的表达；而当加入 IPTG 诱导剂后，外源蛋白 GFP 的表达量迅速增加，可达 20 倍。但该系统在非诱导条件下仍然有低量的表达，同时 IPTG 具有一定毒性，在实际应用中对生态环境不友好，可操作性不高。

2010 年，Verhounig 等<sup>[77]</sup>报道了一个新的诱导系统：利用人工合成的核糖开关(Riboswitch)调控目的蛋白的表达。在茶碱(Theophylline)的诱导下，外源蛋白 GFP 的表达量增加，最重要的是在非诱导条件下，没有背景表达。该系统是利用了一个蛋白翻译水平调控的元件，并不改变外源基因的转录水平。这一体系作为一个新的质体基因诱导系统可以严格调控基因的诱导表达，有着非常广阔的利用价值。

### 2.3 非绿色质体顺式表达元件

尽管在绿色质体——叶绿体系统中, 基因表达调控元件已有很多深入的研究, 如前面介绍的 *Prrn* 启动子是叶绿体表达中最强的启动子, 但在非绿色质体中基因表达调控元件研究还较薄弱。已有研究表明, 利用 *Prrn* 启动子在非绿色组织中转录水平大幅度降低: 外源蛋白在西红柿未成熟的果实或仍保持绿色的成熟果实中能够高效表达, 但在红色的成熟果实中无法检测<sup>[55,66]</sup>; GFP 蛋白在烟草根部的表达量也几乎难以检测到<sup>[67]</sup>。利用 *psbA* 的启动子结合 T7g10 翻译增强序列可以使 GFP 在西红柿成熟果实中的表达量占可溶性总蛋白的 1%<sup>[78]</sup>。利用基因芯片对双子叶植物西红柿和马铃薯(*Solanum tuberosum*)的非绿色组织进行质体全基因组表达谱分析, 发现大部分质体基因在非绿色质体中转录和翻译水平表达量相对于在绿色质体中发生了大幅度下降, 但 *accD* 和 *clpP* 基因的表达量保持稳定<sup>[79,80]</sup>。Zhang 等<sup>[67]</sup>利用玉米(*Zea mays* L.)来源的 *clpP* 的启动子, 不论是配合玉米 *clpP* 的 5'UTR 或是翻译增强元件 T7g10 都能够大大提高外源基因在烟草根部的表达。

### 2.4 多基因表达元件

面对复杂的代谢网络, 需要实现多基因的表达才能实现对重要农艺性状的改良。根据内共生学说, 质体源于原核生物蓝细菌, 因此质体基因的表达模式具有原核生物基因的表达特性——多个基因构成一个多顺反子单元, 能够同时转录和翻译。在质体多基因转化系统中, 将多个基因构建在一个多顺反子单元里, 不仅简化了载体构建难度, 而且能够避免由于启动子的重复使用而引发的非预期的同源重组<sup>[81]</sup>。利用细菌的多顺反子表达单元的质体转化系统进行多基因表达已有多篇报道, 但由于质体基因表达调控机制尚不清楚, 已鉴定的可通用的多基因表达元件不多。Zhou 等<sup>[82]</sup>发现一个命名为多顺反子间基因表达元件(Intercistronic expression element, IEE), 可以介导多顺反子中基因的 mRNA 加工, 形成稳定的单顺反转录子。这一仅有 50 bp 大小的 IEE 元件为质体转化系统的多基因表达提供了一个新的实用工具, 它能够实现对复杂生化途径的调控, 已被利用到了提高植物体内维生素 E 含量以及获得高光效植物的研究中<sup>[55,83]</sup>。

## 3 质体基因工程在植物遗传育种研究中的新进展

运用分子标记辅助选择和转基因技术相结合的策略在实现品种改良的可持续发展目标上发挥着重要作用<sup>[84]</sup>, 其中质体转化体系的运用与优化使得植物品种改良取得了很大的进步。在提高光合效率增加产量方面, 利用质体转化系统将 *rbcL* 蛋白的第 355 位点的亮氨酸改变为缬氨酸, 能够提高光合效率<sup>[85]</sup>; 借助质体转化技术可以将蓝细菌、藻类和陆地植物发达的 CO<sub>2</sub>-浓缩机制(CCMs)导入 C3 植物质体系统中, 定向改造叶绿体基质上的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RuBisCo)来提高 CO<sub>2</sub> 捕获率, 能够克服植物自身 RuBisCo 效率低下的问题<sup>[86,87]</sup>。在不影响 CO<sub>2</sub> 同化过程中 RuBisCo 等关键酶的酶活情况下, 高效表达果糖 1,6-二磷酸醛缩酶能够促进 1,5-二磷酸核酮糖的再生, 促进 CO<sub>2</sub> 的固定, 从而增加光合效率, 促进植物生长发育和提高产量<sup>[88]</sup>。利用质体多基因表达系统, 将编码蓝藻中 RuBisCo 复合体中的大亚基(Se-*rbcL*)、小亚基(Se-*rbcS*)以及组装分子伴侣(Se-*RbcX*)的基因植入烟草叶绿体中, 获得的转基因植株可显著提高 CO<sub>2</sub> 固定效率<sup>[83]</sup>。烟草中共表达拟南芥的 *rbcL* 和 RuBisCo 累积因子 1(*AtRAF1*)后, CO<sub>2</sub> 固定效率比单独表达拟南芥 *rbcL* 的 *tob<sup>AtL</sup>* 植株提高了两倍, 且植物生长速率明显加快<sup>[89]</sup>。这表明, 利用该系统提高作物的光合效率及提高最终产量具有可行性。下文重点阐述利用质体转化系统在抗逆境和品质改良等方面的育种新进展。

### 3.1 抗性性状改良

在将抗虫基因导入质体基因组前, 已经有研究者尝试通过核转化, 借助 *rbcS* 启动子和它自身的叶绿体定位信号肽或拟南芥来源的 *thil* 基因的叶绿体定位信号肽等将表达的抗虫蛋白引导进入植物叶绿体中, 能够实现抗虫蛋白在植物绿色组织中的高量表达<sup>[90-94]</sup>。目前, 利用该体系获得的多种抗虫作物已经进入田间试验阶段。

由于原核来源的抗虫基因的密码子偏爱性与真核细胞不同, 影响抗虫基因在转入植物核基因组后基因的表达效率, 故在核转化系统中抗虫基因需要重新合成<sup>[95-97]</sup>。但将杀虫基因导入质体基因组中则



无需调整基因的密码子偏爱性, 也无需改变调控序列。McBride 等<sup>[98]</sup>通过质体转化技术将苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)来源的抗虫基因 *cry1Ac* 导入到烟草质体基因组中, 首次实现了利用质体基因工程对植物农艺性状的改良, 得到的转基因材料中 Bt 蛋白的表达量远高于核转化的表达量, 表达水平占到可溶性蛋白的 0.2%。在抗虫效果方面, 已有研究表明: Cry1Ac、Cry2Aa2 蛋白对烟芽夜蛾(*Heliothis virescens*)、谷实夜蛾(*Helicoverpa zea*)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)具有极强杀虫活力<sup>[98,99]</sup>; CryIIa5 对棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)产生很好的防御效果<sup>[100]</sup>; 而截短的 Cry9Aa2 能抵御马铃薯块茎蛾(*Phthorimaea operculella*)<sup>[101]</sup>。利用质体转化体系, 转基因烟草植株中 Cry2Aa2 蛋白的最高表达量可达到细胞可溶性蛋白的 45%, 这种超量表达是由于上游操纵子具有一个开放性阅读框, 它能编码一种分子伴侣来帮助 Bt 蛋白的正确折叠和结晶<sup>[102]</sup>。当然, 也有研究表明这种高表达 Bt 蛋白的转基因植株在呈现预期抗虫效果的同时, 有可能较非转基因对照出现迟缓发育的现象<sup>[101]</sup>。这些研究表明, 在育种中应有选择性的利用表达调控元件, 而不是盲目的以高表达量为唯一目标。

随着抗虫基因质体转化技术在烟草中的不断成功, 研究者开始尝试其他作物。Hou 等<sup>[103]</sup>首次在油菜(*Brassica napus*)中实现叶绿体转化, 转 *cry1Aa10* 基因的植株对小菜蛾(*Plutella xylostera*)二龄幼虫的致死率可达 47%; 但遗憾的是, 该研究仅得到异质化的植株, 外源基因无法稳定遗传。随后, Dufourmantel 等<sup>[104]</sup>在大豆质体基因组中导入了 *cry1Ab*, 证实该策略在大豆上进行抗虫育种的可行性。Liu 等<sup>[105]</sup>在两个卷心菜品种成功实现了 *cry1Ab* 的质体转化, 转化植株具有对小菜蛾的杀虫效果, 这也是卷心菜中实现质体转化的首篇报道。本文对已报道的利用质体转化培育的抗性材料进行了汇总, 具体见表 1。总体上看, 质体转化系统可以高量表达外源 Bt 蛋白, 大多数转化植株对害虫的致死率能达到 100%。

目前开发利用的 Bt 蛋白主要是针对鳞翅目和鞘翅目害虫, 并不适用于所有的害虫。Jin 等<sup>[106]</sup>在烟草中表达了针对棉铃虫的茎环结构的双链 RNA(dsRNA), 但是其片段较小, 正义链和负义链分别只有 19 bp, 结果表明对于棉铃虫幼虫的发育有明显影

响, 但不会直接致死。研究发现喂食长链 dsRNAs 比喂食 siRNAs 能够更有效地诱发昆虫体内启动 RNAi 机制<sup>[107,108]</sup>。Zhang 等<sup>[109]</sup>首次利用叶绿体转化系统在烟草和马铃薯中高效表达马铃薯叶甲虫 dsRNAs, 在提高植物抗虫性上取得了突破性进展。由于叶绿体中不具有 RNAi 机制, 因此 dsRNAs 在叶绿体中不会被 Dicer 剪切成 siRNAs。相对于核表达系统, 质体表达 dsRNA 具有明显的抗虫性, 喂食 5 d 后会导致靶标害虫马铃薯叶甲虫死亡。

在叶绿体中表达抗菌蛋白可以增加目的蛋白的表达量, 提高抗病性。质体转化编码氯化物过氧化物酶的 *CPO* 基因, 其 mRNA 转录本相较于核表达系统增加了 15 倍, 转化植株叶片的粗提物能够抑制黄麴霉、轮枝样镰刀菌和棉花萎黄病菌的菌落形成的数量; 转化植株叶片能够明显抵御黑霉病<sup>[110]</sup>。在质体中能够实现小分子抗菌肽 MSI99<sup>[111]</sup>、Retrocyclin-101 和 Protegrin-1<sup>[112]</sup>的高效表达, 其中 Retrocyclin-101 的表达量占可溶性蛋白总量的 32%~38%, 质体转化植株能够抵御细菌和病毒性病害<sup>[112]</sup>。为了培育抗病和抗虫复合性状的转基因植物材料, 除了利用多基因表达元件, 也可以选择高效具有复合抗性的基因。2013 年, Jin 等<sup>[113]</sup>将来源于药用植物半夏的凝集素类抗虫基因——半夏凝集素(*Pinellia ternata* agglutinin, *pta*)基因转化烟草质体。高效表达 PTA 蛋白的转基因烟草不仅能防治烟芽夜蛾等鳞翅目害虫, 有效抑制同翅目昆虫烟蚜(*Myzus persicae*)和烟粉虱(*Bemisia tabaci*)的繁殖, 而且还具有抑制欧文氏杆菌(*Erwinia carotovora*)和烟草花叶病毒(Tobacco mosaic virus, TMV)的作用。

除草剂草甘膦能够抑制植物芳香族氨基酸生物合成过程中的关键酶 EPSPS(5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶), 从而导致植物体中不能合成芳香族氨基酸, 最终抑制植物的生长发育。在植物中, 表达对草甘膦不敏感的 *epsps* 基因是培育耐除草剂作物的主要方式。例如 Ye 等<sup>[114]</sup>将 *epsps* 基因经质体转化技术引入烟草叶绿体基因组后, 获得的转化株对草甘膦表现出高抗。同理, 转 *bar* 基因的质体转化植株能够抗草铵膦<sup>[115]</sup>类除草剂; 将 4-羧基苯丙酮加氧酶基因经叶绿体转化引入烟草叶绿体基因组中, 质体转化植株对异恶唑草酮表现出抗性<sup>[116]</sup>; 质体表达乙酰乳酸合成酶基因(*ALS*)可以抗咪唑啉酮、磺脲类除草剂<sup>[117]</sup>。尽管目前仅在质体转化的模式植物——烟

表 1 已报道的利用质体转化培育的抗性材料

性状	转化受体	目的基因	功能	文献
抗病虫	烟草	<i>cry1Ac</i>	对烟芽夜蛾、谷实夜蛾、甜菜夜蛾具有杀虫活力	[98]
		<i>Cry2Aa2</i>	对烟芽夜蛾、谷实夜蛾、甜菜夜蛾具有杀虫活力	[99,102]
		<i>cry1Ia5</i>	防御棉铃虫	[100]
		<i>cry9Aa2</i>	抵御马铃薯块茎蛾	[101]
		<i>pta</i>	防治烟芽夜蛾，昆虫烟蚜和烟粉虱，抑制欧文氏杆菌和烟草花叶病毒	[113]
		<i>p450 monooxygenase</i> 、 <i>V-ATPase</i> 、几丁质合酶基因的 dsRNA	影响棉铃虫幼虫的发育	[106]
	烟草/土豆	<i>ACT</i> 、 <i>SHR</i> 的 dsRNA	喂食五天后，马铃薯叶甲虫致死	[109]
	油菜	<i>cry1Aa10</i>	抗小菜蛾	[103]
	大豆	<i>cry1Ab</i>	抗黎豆夜蛾	[104]
	卷心菜	<i>cry1Ab</i>	抗小菜蛾	[105]
	烟草	<i>CPO</i> 氯化物过氧化物酶	体外实验表明抗黄麴霉，轮枝样镰刀菌和棉花黄萎病菌，体内实验表明可以抵御黑霉病	[110]
	烟草	抗菌肽 <i>MSI-99</i> 基因	黄曲霉等病毒性病害，以及烟草丁香假单胞菌病害	[111]
	烟草	抗菌肽 <i>Retrocyclin-101</i> 和 <i>Protegrin-1</i> 基因	抵御细菌和病毒性病害	[112]
耐除草剂	烟草	<i>Epsps</i>	对草甘膦表现出高抗	[114]
	烟草	<i>Bar</i>	抗草铵膦	[115]
	烟草	<i>4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase</i>	对异恶唑草酮表现出抗性	[116]
	烟草	乙酰乳酸合酶基因	抗咪唑喹啉酮、磺脲类除草剂	[117]
耐非生物胁迫	烟草	<i>BvCMO</i>	提高甘氨酸甜菜碱含量，从而提高耐盐耐旱性	[118]
	烟草	<i>Delta9</i> -去饱和酶基因	助于抵御冷胁迫	[119]
	烟草	$\alpha$ -生育酚	提高维生素 E 含量，进而提高非生物逆境胁迫抗性	[120]
	烟草	<i>MnSOD</i> 或 <i>gor</i>	通过改善活性氧的清除能力，从而提高一系列耐非生物胁迫	[121]
提供综合抗性	烟草	共表达 <i>sporamin</i> 、 <i>cystatin</i> 和几丁质酶基因	提高包括抗虫性、抗病性、耐盐性，耐高渗透等一系列生物胁迫与非生物胁迫	[122]

草中实现了耐除草剂等农艺性状的改良，但这将为其其他作物的性状改良及商业化生产奠定基础。

烟草中质体高效表达胆碱单加氧酶 *BvCMO* 能够提高甘氨酸甜菜碱含量，从而提高耐盐耐旱性<sup>[118]</sup>。Jin 等<sup>[120]</sup>利用叶绿体表达  $\alpha$ -生育酚提高维生素 E 含量，进而提高非生物逆境胁迫耐受性。在烟草中同时表达甘薯 *sporamin*、芋头半胱氨酸蛋白酶抑制剂 *cystatin* 和几丁质酶可以提高抗虫性、抗病性、耐盐性及耐高渗透等一系列生物胁迫与非生物胁迫<sup>[122]</sup>。

3.2 品质改良

随着人口数量的不断增长、人类生活水平的不断

提高，不仅需要提高作物单位面积产量，改善作物产品品质也成为亟待解决的重大问题，并且开发功能性食品也成为当今作物育种研究的一个重要方向。

植物类异戊二烯是植物体内产生的代谢物，其生物合成存在两条途径：在细胞质中进行的甲羟戊酸(MVA)途径和在质体中进行的丙酮酸磷酸甘油醛(MEP)途径。在质体中进行的 MEP 途径下游的多为植物初级代谢产物，包括类胡萝卜素、植物激素、单萜类以及二萜类物质，是植物生长发育所必需的重要化合物<sup>[123]</sup>。利用 MEP 代谢途径，通过质体转化技术对质体代谢过程中的关键酶进行修饰，能够在很大程度上提高食物的品质。例如在烟草质体基因组中表达合成异戊烯基焦磷酸(IPP)的 1-脱氧木酮



糖-5-还原异构酶(DXR), 可以提高其下游众多代谢产物的含量<sup>[124]</sup>。番茄果实中储藏的番茄红素能够在番茄红素  $\beta$ -环化酶的催化下转化成  $\beta$ -胡萝卜素, 将来源于水仙(*Narcissus pseudonarcissus*)的编码番茄红素  $\beta$ -环化酶的基因(*Lyc*)导入番茄质体基因组中可显著提高番茄红素转变成  $\beta$ -胡萝卜素的效率, 其中  $\beta$ -胡萝卜素含量达到 1 mg/g(干重), 而未转化的对照株中含量仅为 200 ng/g(干重), 而且果实中的类胡萝卜素的总量提高了 0.5 倍, 大大改良了番茄的营养品质<sup>[125,126]</sup>。在质体中同时表达  $\beta$ -胡萝卜素酮酶(CrtW)和  $\beta$ -胡萝卜素环化酶(CrtZ)可以提高叶片中内胡萝卜素总量和虾青素含量。烟草质体转化叶片中内胡萝卜素总含量是野生型的 2.1 倍, 其中虾青素含量占干重的 0.5%, 占总类胡萝卜素含量的 70%<sup>[127]</sup>; 生菜质体转化叶片中内胡萝卜素总量为野生型的 2.6 倍, 其中虾青素占类胡萝卜素的 77.4%<sup>[128]</sup>。利用前文提到的 IEE 元件, 同时表达维生素 E 合成途径中的 3 个基因: 叶绿基转移酶(HPT)、生育酚环化酶(TCY)和生育酚甲基转移酶(TMT), 能够提高番茄果实中维生素 E 的含量<sup>[55]</sup>。

脂类的代谢调控也是研究应用的一个热点, Craig 等<sup>[119]</sup>将来源于南美洲野生土豆品种 *Solanum commersonii* 或是蓝藻品种 *Anacystis nidulans* 的 Delta9-去饱和酶基因转到烟草质体中, 可以提高叶子和种子不饱和油脂的含量, 同时有助于抵御冷胁迫。烟草质体表达来自拟南芥的 3-酮脂酰-酰基载体蛋白合成酶 (Kas) 基因后, 叶子中不饱和油脂 16:0 的含量提高 13%~15%, 饱和油脂 18:0 和 18:1 的含量降低 3%~1%<sup>[129]</sup>。从开发生物能源的角度, 利用质体转化技术同时表达多个基因能够生产可生物降解塑料聚羟基丁酸酯(PHB), 占植物叶片干重的 17.3%<sup>[130,131]</sup>。

#### 4 质体基因工程在作物遗传育种中的展望

尽管利用质体基因工程获得的转基因作物材料已有多个进入了田间试验, 但是目前尚未有获得商业化种植许可进入市场的质体转化材料。质体基因工程体系还存在一些技术上的局限性, 一方面部分外源基因表达量偏低, 另一方面外源蛋白的高表达也可能会对细胞产生毒性(植株叶片白化, 植株生长抑制等)<sup>[132,133]</sup>, 这都归因于可用的调控元件少。因此, 质体基因工程在作物遗传育种中的应用还有待于深入研究质体基因的表达调控机制进而发掘具有

特异时空表达特性的系统与表达元件。

质体基因工程的应用也面临着诸多挑战<sup>[15,17,134,135]</sup>。由于光合系统的复杂性, 改变单一因子不可避免地会影响整个系统的组装和光合效率: 在烟草 *tob<sup>AtL</sup>* 植株中表达拟南芥的 *rbcL* 反而降低了植株中  $\text{CO}_2$  固定效率和植物生长速率<sup>[89]</sup>; 共表达烟草 *rbcS* 和西红柿的 *rbcL* 尽管能够行使光合作用, 但能量转化和 RuBP 的再生速率明显受损<sup>[136]</sup>。植物类异戊二烯在细胞质中的 MVA 代谢网络能够产生丰富多样的植物次生代谢产物, 包括天然的杀虫剂和良好的除草剂、香料工业的重要原料和药物的有效成分。MVA 和 MEP 途径具有共同中间体——异戊烯基焦磷酸(IPP), 如何将细胞质中的复杂代谢网络转入到质体中成为在质体中合成这些植物次生代谢物的限速步骤。因此积极开发质体多基因表达体系, 实现植物整个代谢网络的严密调控, 将为作物育种和生物医药提供新的平台。

植物细胞壁中的主要成分为木质纤维素, 由纤维素、半纤维素与木质素组成。纤维素和半纤维素由单糖(葡萄糖、木糖、甘露糖等)通过  $\beta$ -1,4-糖苷键连接成多聚糖。高效表达水解纤维素酶<sup>[137]</sup>、角质酶、木霉纤维膨胀因子<sup>[138]</sup>、 $\beta$ -甘露聚糖酶<sup>[139]</sup>、 $\beta$ -1,4-葡聚糖酶<sup>[139]</sup>等均可以高效降解木质纤维素, 有利于纤维素的转化和利用。这不但可以提高饲料中纤维素的利用率, 还有助于植物秸秆在生产燃料乙醇和其他生物燃料中的应用, 缓解日渐严重的能源危机、环境污染等问题。质体转化系统亦可应用于在植物修复技术中, 高效解决环境污染问题, 具有广阔的应用前景。高效表达 *merAB* 操纵子的质体转化烟草植株能够在 400  $\mu\text{mol/L}$  醋酸苯汞(PMA)土壤中存活, 且增加植物叶片的干重<sup>[140]</sup>; 质体表达金属硫蛋白<sup>[141]</sup>的转化植株能够耐受 20  $\mu\text{mol/L}$  汞, 有利于植物对于土壤中汞的吸收, 其叶片中汞的含量高达 106 ng。

世界上主要的粮食作物多为单子叶植物, 其中水稻和小麦利用 C3 光合途径, 利用一系列基因工程策略, 增加光合产量和水分利用效率来提高物种的光合作用被视为一类很有前途的作物改良策略。如前所述, 可以定向特异改变叶绿体基质上的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RuBisCo)提高  $\text{CO}_2$  捕获率。但遗憾的是目前单子叶植物, 尤其是主要农作物的质体转化技术仍不成熟。至今, 在玉米中尚未

见关于质体转化系统建立的报道,而仅有 3 篇水稻质体转化的报道<sup>[142-144]</sup>中所得到的转化植株均是异质体植株,尚未达到同质化。建立单子叶植物质体转化系统的主要困难是在于单子叶植物对于链霉素、壮观霉素不敏感<sup>[145]</sup>,尚无合适的筛选标记基因;同时,通常转化受体为非绿色愈伤组织,且筛选过程一般在黑暗条件下进行,缺乏在特异组织和环境条件下的表达调控元件,不利于筛选基因的表达。目前亟需跳出双子叶植物转化系统的框架,将质体转化技术这一个新兴的育种手段在单子叶植物水稻和玉米中真正建立起来,提高转化效率、保障高效表达、实现同质化,才能在更大程度上推动质体转化育种技术的广泛运用。随着植物质体基因工程体系的不断优化与应用,解决传统遗传转化存在的弊端,将为生物技术的发展注入新的生机和活力,有利于发展资源节约和环境友好的两型农业。

## 参考文献

- [1] Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY, Martin W. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(2): 123-135. [DOI]
- [2] Bock R, Timmis JN. Reconstructing evolution: gene transfer from plastids to the nucleus. *BioEssays*, 2008, 30(6): 556-566. [DOI]
- [3] Sugiura M. The chloroplast genome. *Plant Mol Biol*, 1992, 19(1): 149-168. [DOI]
- [4] Bock R. Structure, function, and inheritance of plastid genomes. In: Bock R, ed. *Cell and Molecular Biology of Plastids*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2007, 29-63. [DOI]
- [5] Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 1988, 240(4858): 1534-1538. [DOI]
- [6] Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(21): 8526-8530. [DOI]
- [7] Day A. Reverse genetics in flowering plant plastids. In: Bock R, Knoop V, eds. *Genomics of Chloroplasts and Mitochondria*. Netherlands: Springer, 2012: 415-441. [DOI]
- [8] Tiller N, Weingartner M, Thiele W, Maximova E, Schöttler MA, Bock R. The plastid-specific ribosomal proteins of *Arabidopsis thaliana* can be divided into non-essential proteins and genuine ribosomal proteins. *Plant J*, 2012, 69(2): 302-316. [DOI]
- [9] Fleischmann TT, Scharff LB, Alkatib S, Hasdorf S, Schöttler MA, Bock R. Nonessential plastid-encoded ribosomal proteins in tobacco: a developmental role for plastid translation and implications for reductive genome evolution. *Plant Cell*, 2011, 23(9): 3137-3155. [DOI]
- [10] Rogalski M, Schöttler MA, Thiele W, Schulze WX, Bock R. Rpl33, a nonessential plastid-encoded ribosomal protein in tobacco, is required under cold stress conditions. *Plant Cell*, 2008, 20(8): 2221-2237. [DOI]
- [11] Tiller N, Bock R. The translational apparatus of plastids and its role in plant development. *Mol Plant*, 2014, 7(7): 1105-1120. [DOI]
- [12] Kanevski I, Maliga P, Rhoades DF, Gutteridge S. Plastome engineering of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in tobacco to form a sunflower large subunit and tobacco small subunit hybrid. *Plant Physiol*, 1999, 119(1): 133-142. [DOI]
- [13] Petersen K, Schöttler MA, Karcher D, Thiele W, Bock R. Elimination of a group II intron from a plastid gene causes a mutant phenotype. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): 5181-5192. [DOI]
- [14] Bock R, Kössel H, Maliga P. Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype. *Embo J*, 1994, 13(19): 4623-4628. [DOI]
- [15] Bock R. Genetic engineering of the chloroplast: novel tools and new applications. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 26: 7-13. [DOI]
- [16] Day A, Goldschmidt-Clermont M. The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(5): 540-553. [DOI]
- [17] Maliga P. Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 289-313. [DOI]
- [18] Bock R. Engineering plastid genomes: methods, tools, and applications in basic research and biotechnology. *Annu Rev Plant Biol*, 2015, 66(1): 211-241. [DOI]
- [19] 王金辉, 李轶女, 倪丕冲, 王国增, 张志芳, 沈桂芳. 叶绿体转化体系研究进展. *生物技术通报*, 2012, (1): 1-6. [DOI]
- [20] Clarke JL, Waheed MT, Lössl AG, Martinussen I, Daniell H. How can plant genetic engineering contribute

- to cost-effective fish vaccine development for promoting sustainable aquaculture? *Plant Mol Biol*, 2013, 83(1–2): 33–40. [DOI]
- [21] Hassan SW, Waheed MT, Müller M, Clarke JL, Shinwari ZK, Lössl AG. Expression of HPV-16 L1 capsomeres with glutathione-S-transferase as a fusion protein in tobacco plastids: an approach for a capsomere-based HPV vaccine. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10(10): 2975–2982. [DOI]
- [22] Gorantala J, Grover S, Rahi A, Chaudhary P, Rajwanshi R, Sarin NB, Bhatnagar R. Generation of protective immune response against anthrax by oral immunization with protective antigen plant-based vaccine. *J Biotechnol*, 2014, 176: 1–10. [DOI]
- [23] Gorantala J, Grover S, Goel D, Rahi A, Magani SKJ, Chandra S, Bhatnagar R. A plant based protective antigen [PA(dIV)] vaccine expressed in chloroplasts demonstrates protective immunity in mice against anthrax. *Vaccine*, 2011, 29(27): 4521–4533. [DOI]
- [24] Abdoli-Nasab M, Jalali-Javaran M, Cusidó RM, Palazón J, Baghizadeh A, Alizadeh H. Expression of the truncated tissue plasminogen activator (*K2S*) gene in tobacco chloroplast. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(10): 5749–5758. [DOI]
- [25] Yácono MDL, Farran I, Becher ML, Sander V, Sánchez VR, Martín V, Veramendi J, Clemente M. A chloroplast-derived *Toxoplasma gondii* GRA4 antigen used as an oral vaccine protects against toxoplasmosis in mice. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10(9): 1136–1144. [DOI]
- [26] Kolotilin I, Kaldis A, Devriendt B, Joensuu J, Cox E, Menassa R. Production of a subunit vaccine candidate against porcine post-weaning diarrhea in high-biomass transplastomic tobacco. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42405. [DOI]
- [27] Scotti N, Cardi T. Plastid transformation as an expression tool for plant-derived biopharmaceuticals. *Methods Mol Biol*, 2012, 847: 451–466. [DOI]
- [28] Khan MS, Nurjis F. Synthesis and expression of recombinant interferon alpha-5 gene in tobacco chloroplasts, a non-edible plant. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4): 4391–4400. [DOI]
- [29] Gisby MF, Mellors P, Madesis P, Ellin M, Lavery H, O’Kane S, Ferguson MW, Day A. A synthetic gene increases TGF  $\beta$ 3 accumulation by 75-fold in tobacco chloroplasts enabling rapid purification and folding into a biologically active molecule. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(5): 618–628. [DOI]
- [30] Dolgin E. Immunology: Oral solutions. *Nature*, 2014, 515(7528): S166–S167. [DOI]
- [31] Shil PK, Kwon KC, Zhu P, Verma A, Daniell H, Li QH. Oral delivery of ACE2/Ang-(1–7) bioencapsulated in plant cells protects against experimental uveitis and autoimmune uveoretinitis. *Mol Ther*, 2014, 22(12): 2069–2082. [DOI]
- [32] Shenoy V, Kwon KC, Rathinasabapathy A, Lin SN, Jin GY, Song CJ, Shil P, Nair A, Qi YF, Li QH, Francis J, Katovich MJ, Daniell H, Raizada MK. Oral delivery of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-(1–7) bioencapsulated in plant cells attenuates pulmonary hypertension. *Hypertension*, 2014, 64(6): 1248–1259. [DOI]
- [33] Wang XM, Su J, Sherman A, Rogers GL, Liao GX, Hoffman BE, Leong KW, Terhorst C, Daniell H, Herzog RW. Plant-based oral tolerance to hemophilia therapy employs a complex immune regulatory response including LAP<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. *Blood*, 2015, 125(15): 2418–2427. [DOI]
- [34] Sherman A, Su J, Lin SN, Wang XM, Herzog RW, Daniell H. Suppression of inhibitor formation against FVIII in a murine model of hemophilia A by oral delivery of antigens bioencapsulated in plant cells. *Blood*, 2014, 124(10): 1659–1668. [DOI]
- [35] 巩智刚, 徐芳, 周海鹏, 王雯雯, 王玉华. 叶绿体转化及其用于疫苗表达研究的最新进展. 基因组学与应用生物学, 2012, 31(3): 310–319. [DOI]
- [36] 巩智刚, 周海鹏, 徐芳, 韩晓玲, 王玉华. 叶绿体转化及其应用于作物改良研究的最新进展. 核农学报, 2012, 26(2): 288–294. [DOI]
- [37] Svab Z, Harper EC, Jones JDG, Maliga P. Aminoglycoside-3"-adenyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol*, 1990, 14(2): 197–205. [DOI]
- [38] Svab Z, Maliga P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(3): 913–917. [DOI]
- [39] Carrer H, Hockenberry TN, Svab Z, Maliga P. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Mol Gen Genet*, 1993, 241(1–2): 49–56. [DOI]
- [40] Huang FC, Klaus SM, Herz S, Zou Z, Koop HU, Golds TJ. Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA-6* gene and kanamycin selection. *Mol Genet Genomics*, 2002, 268(1): 19–27. [DOI]
- [41] Li WM, Ruf S, Bock R. Chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker for plastid transformation. *Plant Mol Biol*, 2011, 76(3–5): 443–451. [DOI]



- [42] Barone P, Zhang XH, Widholm JM. Tobacco plastid transformation using the feedback-insensitive anthranilate synthase [ $\alpha$ ]-subunit of tobacco (ASA2) as a new selectable marker. *J Exp Bot*, 2009, 60(11): 3195–3202. [DOI]
- [43] Gisby MF, Mudd EA, Day A. Growth of transplastomic cells expressing D-amino acid oxidase in chloroplasts is tolerant to D-alanine and inhibited by D-valine. *Plant Physiol*, 2012, 160(4): 2219–2226. [DOI]
- [44] Iamtham S, Day A. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(11): 1172–1176. [DOI]
- [45] Klaus SMJ, Huang FC, Golds TJ, Koop HU. Generation of marker-free plastid transformants using a transiently cointegrated selection gene. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(2): 225–229. [DOI]
- [46] Kittiwongwattana C, Lutz K, Clark M, Maliga P. Plastid marker gene excision by the phiC31 phage site-specific recombinase. *Plant Mol Biol*, 2007, 64(1–2): 137–143. [DOI]
- [47] Khan MS, Khalid AM, Malik KA. Phage phiC31 integrase: a new tool in plastid genome engineering. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(1): 1–3. [DOI]
- [48] Shao M, Kumar S, Thomson JG. Precise excision of plastid DNA by the large serine recombinase Bxb1. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(3): 322–329. [DOI]
- [49] Bock R. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol*, 2001, 312(3): 425–438. [DOI]
- [50] Bock R, Khan MS. Taming plastids for a green future. *Trends Biotechnol*, 2004, 22(6): 311–318. [DOI]
- [51] Nugent GD, Ten Have M, van der Gulik A, Dix PJ, Uijtewaal BA, Mordhorst AP. Plastid transformants of tomato selected using mutations affecting ribosome structure. *Plant Cell Rep*, 2005, 24(6): 341–349. [DOI]
- [52] Lelivelt CLC, McCabe MS, Newell CA, deSnoo CB, van Dun KM, Birch-Machin I, Gray JC, Mills KHG, Nugent JM. Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 2005, 58(6): 763–774. [DOI]
- [53] Díaz AH, Koop HU. *Nicotiana tabacum*: PEG-Mediated Plastid Transformation. In: Maliga P, ed. *Chloroplast Biotechnology: Methods and Protocols*. Humana Press, 2014: 165–175. [DOI]
- [54] Elghabi Z, Ruf S, Bock R. Biolistic co-transformation of the nuclear and plastid genomes. *Plant J*, 2011, 67(5): 941–948. [DOI]
- [55] Lu YH, Rijzaani H, Karcher D, Ruf S, Bock R. Efficient metabolic pathway engineering in transgenic tobacco and tomato plastids with synthetic multigene operons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(8): E623–632. [DOI]
- [56] Stegemann S, Bock R. Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts. *Science*, 2009, 324(5927): 649–651. [DOI]
- [57] Stegemann S, Keuthe M, Greiner S, Bock R. Horizontal transfer of chloroplast genomes between plant species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(7): 2434–2438. [DOI]
- [58] Fuentes I, Stegemann S, Golczyk H, Karcher D, Bock R. Horizontal genome transfer as an asexual path to the formation of new species. *Nature*, 2014, 511(7508): 232–235. [DOI]
- [59] Inka Borchers AM, Gonzalez-Rabade N, Gray JC. Increased accumulation and stability of rotavirus VP6 protein in tobacco chloroplasts following changes to the 5' untranslated region and the 5' end of the coding region. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10(4): 422–434. [DOI]
- [60] Monde RA, Greene JC, Stern DB. The sequence and secondary structure of the 3'-UTR affect 3'-end maturation, RNA accumulation, and translation in tobacco chloroplasts. *Plant Mol Biol*, 2000, 44(4): 529–542. [DOI]
- [61] Kuroda H, Maliga P. Complementarity of the 16S rRNA penultimate stem with sequences downstream of the AUG destabilizes the plastid mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(4): 970–975. [DOI]
- [62] Kuroda H, Maliga P. Sequences downstream of the translation initiation codon are important determinants of translation efficiency in chloroplasts. *Plant Physiol*, 2001, 125(1): 430–436. [DOI]
- [63] Yang HJ, Gray BN, Ahner BA, Hanson MR. Bacteriophage 5' untranslated regions for control of plastid transgene expression. *Planta*, 2013, 237(2): 517–527. [DOI]
- [64] Gray BN, Yang HJ, Ahner BA, Hanson MR. An efficient downstream box fusion allows high-level accumulation of active bacterial beta-glucosidase in tobacco chloroplasts. *Plant Mol Biol*, 2011, 76(3–5): 345–355. [DOI]
- [65] Rogalski M, Ruf S, Bock R. Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(16): 4537–4545. [DOI]
- [66] Zhou F, Badillo-Corona JA, Karcher D, Gonzalez-Rabade N, Piepenburg K, Borchers A-MI, Maloney AP, Kavanagh TA, Gray JC, Bock R. High-level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant Biotechnol J*,

- 2008, 6(9): 897–913. [DOI]
- [67] Zhang J, Ruf S, Hasse C, Childs L, Scharff LB, Bock R. Identification of cis-elements conferring high levels of gene expression in non-green plastids. *Plant J*, 2012, 72(1): 115–128. [DOI]
- [68] Oey M, Lohse M, Scharff LB, Kreikemeyer B, Bock R. Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(16): 6579–6584. [DOI]
- [69] Gottschamel J, Waheed MT, Clarke JL, Lössl AG. A novel chloroplast transformation vector compatible with the Gateway® recombination cloning technology. *Transgenic Res*, 2013, 22(6): 1273–1278. [DOI]
- [70] Oey M, Lohse M, Kreikemeyer B, Bock R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic. *Plant J*, 2009, 57(3): 436–445. [DOI]
- [71] Varshavsky A. The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells*, 1997, 2(1): 13–28. [DOI]
- [72] Apel W, Schulze WX, Bock R. Identification of protein stability determinants in chloroplasts. *Plant J*, 2010, 63(4): 636–650. [DOI]
- [73] Elghabi Z, Karcher D, Zhou F, Ruf S, Bock R. Optimization of the expression of the HIV fusion inhibitor cyanovirin-N from the tobacco plastid genome. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(5): 599–608. [DOI]
- [74] Magee AM, Coyne S, Murphy D, Horvath EM, Medgyesy P, Kavanagh TA. T7 RNA polymerase-directed expression of an antibody fragment transgene in plastids causes a semi-lethal pale-green seedling phenotype. *Transgenic Res*, 2004, 13(4): 325–337. [DOI]
- [75] Lössl A, Bohmert K, Harloff H, Eibl C, Mühlbauer S, Koop HU. Inducible trans-activation of plastid transgenes: expression of the *R. eutrophaphb* operon in transplastomic tobacco. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(9): 1462–1471. [DOI]
- [76] Mühlbauer SK, Koop HU. External control of transgene expression in tobacco plastids using the bacterial lac repressor. *Plant J*, 2005, 43(6): 941–946. [DOI]
- [77] Verhounig A, Karcher D, Bock R. Inducible gene expression from the plastid genome by a synthetic riboswitch. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(14): 6204–6209. [DOI]
- [78] Caroca R, Howell KA, Hasse C, Ruf S, Bock R. Design of chimeric expression elements that confer high-level gene activity in chromoplasts. *Plant J*, 2013, 73(3): 368–379. [DOI]
- [79] Kahlau S, Bock R. Plastid transcriptomics and translomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. *Plant Cell*, 2008, 20(4): 856–874. [DOI]
- [80] Valkov VT, Scotti N, Kahlau S, Maclean D, Grillo S, Gray JC, Bock R, Cardi T. Genome-wide analysis of plastid gene expression in potato leaf chloroplasts and tuber amyloplasts: transcriptional and posttranscriptional control. *Plant Physiol*, 2009, 150(4): 2030–2044. [DOI]
- [81] Scharff LB, Bock R. Synthetic biology in plastids. *Plant J*, 2014, 78(5): 783–798. [DOI]
- [82] Zhou F, Karcher D, Bock R. Identification of a plastid intercistronic expression element (IEE) facilitating the expression of stable translatable monocistronic mRNAs from operons. *Plant J*, 2007, 52(5): 961–972. [DOI]
- [83] Lin MT, Occhialini A, Andralojc PJ, Parry MAJ, Hanson MR. A faster Rubisco with potential to increase photosynthesis in crops. *Nature*, 2014, 513(7519): 547–550. [DOI]
- [84] Chen H, Lin YJ, Zhang QF. Review and prospect of transgenic rice research. *Chin Sci Bull*, 2009, 54(22): 4049–4068. [DOI]
- [85] Whitney SM, Sharwood RE. Construction of a tobacco master line to improve Rubisco engineering in chloroplasts. *J Exp Bot*, 2008, 59(7): 1909–1921. [DOI]
- [86] Pengelly JLL, Förster B, von Caemmerer S, Badger MR, Price GD, Whitney SM. Transplastomic integration of a cyanobacterial bicarbonate transporter into tobacco chloroplasts. *J Exp Bot*, 2014, 65(12): 3071–3080. [DOI]
- [87] Lin MT, Occhialini A, Andralojc PJ, Devonshire J, Hines KM, Parry MA, Hanson MR.  $\beta$ -Carboxysomal proteins assemble into highly organized structures in Nicotiana chloroplasts. *Plant J*, 2014, 79(1): 1–12. [DOI]
- [88] Uematsu K, Suzuki N, Iwamae T, Inui M, Yukawa H. Increased fructose 1, 6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants. *J Exp Bot*, 2012, 63(8): 3001–3009. [DOI]
- [89] Whitney SM, Birch R, Kelso C, Beck JL, Kapralov MV. Improving recombinant Rubisco biogenesis, plant photosynthesis and growth by coexpressing its ancillary RAF1 chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(11): 3564–3569. [DOI]
- [90] Wong EY, Hironaka CM, Fischhoff DA. *Arabidopsis*

- thaliana* small subunit leader and transit peptide enhance the expression of *Bacillus thuringiensis* proteins in transgenic plants. *Plant Mol Biol*, 1992, 20(1): 81–93. [DOI]
- [91] Kim EH, Suh SC, Park BS, Shin KS, Kweon SJ, Han EJ, Park SH, Kim YS, Kim JK. Chloroplast-targeted expression of synthetic cry1Ac in transgenic rice as an alternative strategy for increased pest protection. *Planta*, 2009, 230(2): 397–405. [DOI]
- [92] Ye RJ, Huang HQ, Yang Z, Chen TY, Liu L, Li XH, Chen H, Lin YJ. Development of insect-resistant transgenic rice with Cry1C\*-free endosperm. *Pest Manag Sci*, 2009, 65(9): 1015–1020. [DOI]
- [93] Wu JH, Tian YH. Development of insect-resistant transgenic cotton with chimeric TVip3A accumulating in chloroplasts. *Methods Mol Biol*, 2013, 958: 247–258. [DOI]
- [94] Wu JH, Luo XL, Zhang XR, Shi YJ, Tian YC. Development of insect-resistant transgenic cotton with chimeric TVip3A\* accumulating in chloroplasts. *Transgenic Res*, 2011, 20(5): 963–973. [DOI]
- [95] Tu JM, Zhang GA, Datta K, Xu CG, He YQ, Zhang QF, Khush GS, Datta SK. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing bacillus thuringiensis delta-endotoxin. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(10): 1101–1104. [DOI]
- [96] Chen H, Zhang GA, Zhang QF, Lin YJ. Effect of transgenic *Bacillus thuringiensis* rice lines on mortality and feeding behavior of rice stem borers (Lepidoptera: Crambidae). *J Econ Entomol*, 2008, 101(1): 182–189. [DOI]
- [97] 唐微, 林拥军. 转 cry1Ab 基因抗虫水稻的田间试验. *遗传*, 2007, 29(8): 1008–1012. [DOI]
- [98] McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ, Hogan PS, Stalker DM, Maliga P. Amplification of a chimeric Bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Biotechnology (N Y)*, 1995, 13(4): 362–365. [DOI]
- [99] Kota M, Daniell H, Varma S, Garczynski SF, Gould F, Moar WJ. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 1840–1845. [DOI]
- [100] Reddy VS, Leelavathi S, Selvapandian A, Raman R, Giovanni F, Shukla V, Bhatnagar RK. Analysis of chloroplast transformed tobacco plants with cryIIa5 under rice *psbA* transcriptional elements reveal high level expression of Bt toxin without imposing yield penalty and stable inheritance of transplastome. *Mol Breed*, 2002, 9(4): 259–269. [DOI]
- [101] Chakrabarti SK, Lutz KA, Lertwiriawong B, Svab Z, Maliga P. Expression of the cry9Aa 2 *B.t.* gene in tobacco chloroplasts confers resistance to potato tuber moth. *Transgenic Res*, 2006, 15(4): 481–488. [DOI]
- [102] De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H. Overexpression of the *Bt cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(1): 71–74. [DOI]
- [103] Hou BK, Zhou YH, Wan LH, Zhang ZL, Shen GF, Chen ZH, Hu ZM. Chloroplast transformation in oilseed rape. *Transgenic Res*, 2003, 12(1): 111–114. [DOI]
- [104] Dufourmantel N, Tissot G, Goutorbe F, Garçon F, Muhr C, Jansens S, Pelissier B, Peltier G, Dubald M. Generation and analysis of soybean plastid transformants expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protoxin. *Plant Mol Biol*, 2005, 58(5): 659–668. [DOI]
- [105] Liu CW, Lin C-C, Yiu J-C, Chen JJW, Tseng M-J. Expression of a *Bacillus thuringiensis* toxin (cry1Ab) gene in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) chloroplasts confers high insecticidal efficacy against *Plutella xylostella*. *Theor Appl Genet*, 2008, 117(1): 75–88. [DOI]
- [106] Jin SX, Singh ND, Li LB, Zhang XL, Daniell H. Engineered chloroplast dsRNA silences cytochrome *p450 monooxygenase*, *V-ATPase* and *chitin synthase* genes in the insect gut and disrupts *Helicoverpa armigera* larval development and pupation. *Plant Biotechnol J*, 2015, 13(3): 435–446. [DOI]
- [107] Kumar P, Pandit SS, Baldwin IT. Tobacco rattle virus vector: A rapid and transient means of silencing manduca sexta genes by plant mediated RNA interference. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31347. [DOI]
- [108] Bolognesi R, Ramaseshadri P, Anderson J, Bachman P, Clinton W, Flannagan R, Ilagan O, Lawrence C, Levine S, Moar W, Mueller G, Tan JG, Uffman J, Wiggins E, Heck G, Segers G. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS One*, 2012, 7(10): e47534. [DOI]
- [109] Zhang J, Khan SA, Hasse C, Ruf S, Heckel DG, Bock R. Full crop protection from an insect pest by expression of long double-stranded RNAs in plastids. *Science*, 2015, 347(6225): 991–994. [DOI]
- [110] Ruhlman TA, Rajasekaran K, Cary JW. Expression of chloroperoxidase from *Pseudomonas pyrrrocinia* in



- tobacco plastids for fungal resistance. *Plant Sci*, 2014, 228: 98–106. [DOI]
- [111] DeGray G, Rajasekaran K, Smith F, Sanford J, Daniell H. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol*, 2001, 127(3): 852–862. [DOI]
- [112] Lee SB, Li BC, Jin SX, Daniell H. Expression and characterization of antimicrobial peptides Retrocyclin-101 and Protegrin-1 in chloroplasts to control viral and bacterial infections. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(1): 100–115. [DOI]
- [113] Jin SX, Zhang XL, Daniell H. *Pinellia ternata* agglutinin expression in chloroplasts confers broad spectrum resistance against aphid, whitefly, *Lepidopteran* insects, bacterial and viral pathogens. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10(3): 313–327. [DOI]
- [114] Ye GN, Hajdukiewicz PTJ, Broyles D, Rodriguez D, Xu CW, Nehra N, Staub JM. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. *Plant J*, 2001, 25(3): 261–270. [DOI]
- [115] Lutz KA, Knapp JE, Maliga P. Expression of bar in the plastid genome confers herbicide resistance. *Plant Physiol*, 2001, 125(4): 1585–1590. [DOI]
- [116] Dufourmantel N, Dubald M, Matringe M, Canard H, Garcon F, Job C, Kay E, Wisniewski J-P, Ferullo J-M, Pelissier B, Sailland A, Tissot G. Generation and characterization of soybean and marker-free tobacco plastid transformants over-expressing a bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase which provides strong herbicide tolerance. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5(1): 118–133. [DOI]
- [117] Shimizu M, Goto M, Hanai M, Shimizu T, Izawa N, Kanamoto H, Tomizawa KI, Yokota A, Kobayashi H. Selectable tolerance to herbicides by mutated acetolactate synthase genes integrated into the chloroplast genome of tobacco. *Plant Physiol*, 2008, 147(4): 1976–1983. [DOI]
- [118] Zhang J, Tan W, Yang XH, Zhang HX. Plastid-expressed choline monooxygenase gene improves salt and drought tolerance through accumulation of glycine betaine in tobacco. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(6): 1113–1124. [DOI]
- [119] Craig W, Lenzi P, Scotti N, De Palma M, Saggese P, Carbone V, McGrath Curran N, Magee AM, Medgyesy P, Kavanagh TA, Dix PJ, Grillo S, Cardi T. Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance. *Transgenic Res*, 2008, 17(5): 769–782. [DOI]
- [120] Jin SX, Daniell H. Expression of  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase in chloroplasts results in massive proliferation of the inner envelope membrane and decreases susceptibility to salt and metal-induced oxidative stresses by reducing reactive oxygen species. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(9): 1274–1285. [DOI]
- [121] Poage M, Le Martret B, Jansen MAK, Nugent GD, Dix PJ. Modification of reactive oxygen species scavenging capacity of chloroplasts through plastid transformation. *Plant Mol Biol*, 2011, 76(3–5): 371–384. [DOI]
- [122] Chen PJ, Senthilkumar R, Jane WN, He Y, Tian ZH, Yeh KW. Transplastomic *Nicotiana benthamiana* plants expressing multiple defence genes encoding protease inhibitors and chitinase display broad-spectrum resistance against insects, pathogens and abiotic stresses. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12(4): 503–515. [DOI]
- [123] Vranová E, Coman D, Grussem W. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 665–700. [DOI]
- [124] Hasunuma T, Takeno S, Hayashi S, Sendai M, Bamba T, Yoshimura S, Tomizawa KI, Fukusaki E, Miyake C. Overexpression of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene in chloroplast contributes to increment of isoprenoid production. *J Biosci Bioeng*, 2008, 105(5): 518–526. [DOI]
- [125] Apel W, Bock R. Enhancement of carotenoid biosynthesis in transplastomic tomatoes by induced lycopene-to-provitamin A conversion. *Plant Physiol*, 2009, 151(1): 59–66. [DOI]
- [126] Wurbs D, Ruf S, Bock R. Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *Plant J*, 2007, 49(2): 276–288. [DOI]
- [127] Hasunuma T, Miyazawa SI, Yoshimura S, Shinzaki Y, Tomizawa KI, Shindo K, Choi SK, Misawa N, Miyake C. Biosynthesis of astaxanthin in tobacco leaves by transplastomic engineering. *Plant J*, 2008, 55(5): 857–868. [DOI]
- [128] Harada H, Maoka T, Osawa A, Hattan JI, Kanamoto H, Shindo K, Otomatsu T, Misawa N. Construction of transplastomic lettuce (*Lactuca sativa*) dominantly producing astaxanthin fatty acid esters and detailed chemical analysis of generated carotenoids. *Transgenic Res*, 2014, 23(2): 303–315. [DOI]
- [129] Dunne A, Maple-Grødem J, Gargano D, Haslam RP, Napier JA, Chua NH, Russell R, Møller SG. Modifying fatty acid profiles through a new cytokinin-based plastid

- transformation system. *Plant J*, 2014, 80(6): 1131–1138. [DOI]
- [130] Arai Y, Shikanai T, Doi Y, Yoshida S, Yamaguchi I, Nakashita H. Production of polyhydroxybutyrate by polycistronic expression of bacterial genes in tobacco plastid. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45(9): 1176–1184. [DOI]
- [131] Bohmert-Tatarev K, McAvoy S, Daughtry S, Peoples OP, Snell KD. High levels of bioplastic are produced in fertile transplastomic tobacco plants engineered with a synthetic operon for the production of polyhydroxybutyrate. *Plant Physiol*, 2011, 155(4): 1690–1708. [DOI]
- [132] Hennig A, Bonfig K, Roitsch T, Warzecha H. Expression of the recombinant bacterial outer surface protein A in tobacco chloroplasts leads to thylakoid localization and loss of photosynthesis. *FEBS J*, 2007, 274(21): 5749–5758. [DOI]
- [133] Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg J, van Wijk KJ, Dougan G, Maliga P. Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(4): 1174–1179. [DOI]
- [134] Bock R. Engineering chloroplasts for high-level foreign protein expression. *Methods Mol Biol*, 2014, 1132: 93–106. [DOI]
- [135] Clarke JL, Daniell H. Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives. *Plant Mol Biol*, 2011, 76(3–5): 211–220. [DOI]
- [136] Zhang XH, Webb J, Huang YH, Lin L, Tang RS, Liu AM. Hybrid Rubisco of tomato large subunits and tobacco small subunits is functional in tobacco plants. *Plant Sci*, 2011, 180(3): 480–488. [DOI]
- [137] Petersen K, Bock R. High-level expression of a suite of thermostable cell wall-degrading enzymes from the chloroplast genome. *Plant Mol Biol*, 2011, 76(3–5): 311–321. [DOI]
- [138] Verma D, Jin SX, Kanagaraj A, Singh ND, Daniel J, Kolattukudy PE, Miller M, Daniell H. Expression of fungal cutinase and swollenin in tobacco chloroplasts reveals novel enzyme functions and/or substrates. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57187. [DOI]
- [139] Agrawal P, Verma D, Daniell H. Expression of *Trichoderma reesei*  $\beta$ -mannanase in tobacco chloroplasts and its utilization in lignocellulosic woody biomass hydrolysis. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29302. [DOI]
- [140] Ruiz ON, Hussein HS, Terry N, Daniell H. Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiol*, 2003, 132(3): 1344–1352. [DOI]
- [141] Ruiz ON, Alvarez D, Torres C, Roman L, Daniell H. Metallothionein expression in chloroplasts enhances mercury accumulation and phytoremediation capability. *Plant Biotechnol J*, 2011, 9(5): 609–617. [DOI]
- [142] Khan MS, Maliga P. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(9): 910–915. [DOI]
- [143] Lee SM, Kang K, Chung H, Yoo SH, Xu XM, Lee S-B, Cheong J-J, Daniell H, Kim M. Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. *Mol Cells*, 2006, 21(3): 401–410. [DOI]
- [144] 李轶女, 孙丙耀, 苏宁, 孟祥勋, 张志芳, 沈桂芳. 水稻叶绿体表达体系的建立及抗 PPT 叶绿体转化植株的获得. *中国农业科学*, 2007, 40(9): 1849–1855. [DOI]
- [145] 李丁. 以潮霉素为筛选标记的水稻叶绿体转化体系的建立[学位论文]. 长沙: 中南大学, 2013. [DOI]

(责任编辑: 邢永忠)