

棉花叶绿体基因组的研究进展

江媛¹,俞嘉宁^{1*},姚艳玲¹,宋美珍²,范术丽²

(1.陕西师范大学生命科学院,陕西 西安 710062;2.中国农业科学院棉花研究所/农业部棉花遗传改良重点实验室,河南 安阳 455000)

摘要:近年来,随着分子生物学技术的应用与发展,对棉花叶绿体基因组也有了新认识。本文概述了棉花叶绿体基因组的研究进展,从棉花叶绿体基因组的图谱、功能基因的克隆及研究、叶绿体 RNA 编辑以及叶绿体转化等方面进行了介绍和评述,并对其在基础研究与应用研究中的前景进行了展望。

关键词:棉花;叶绿体基因组;RNA 编辑;叶绿体转化

中图分类号:S562.03 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2010)05-0495-06

Research Progress of Cotton Chloroplast Genome

JIANG Yuan¹, YU Jia-ning^{1*}, YAO Yan-ling¹, SONG Mei-zhen², FAN Shu-li²

(1. College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China; 2. Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key laboratory of Cotton Genetics Improvement, MOA, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract: In recent years, along with the application and development of molecular biology techniques, we have got new knowledge of cotton chloroplast genome. In this review, we introduce the research progresses of gene map of the *Gossypium hirsutum* chloroplast genome. It mainly focused on the mapping of cotton chloroplast genome, the cloning and functional analyzing of protein-coding genes, RNA editing and transformation in chloroplast of cotton. More over, the prospect of application in further study in cotton was also discussed.

Key words: cotton; chloroplast genome; RNA editing; chloroplast transformation

棉花是世界上最重要的天然纤维来源,也是世界上最重要的经济作物之一。棉属(*Gossypium*) 在分类上属于被子植物锦葵目(*Malvales*)、锦葵科(*Malvaceae*)、棉族(*Gossypiceae*)。现在棉属约有 50 多个棉种^[1],共分为 8 个二倍体基因组群(即 A~G 和 K)和 1 个异源多倍体基因组群(即 AD 基因组^[2-4])。

叶绿体是植物细胞中与光合作用直接相关的细胞器,也是淀粉、脂肪酸、叶绿素、胡萝卜素、嘌呤、嘧啶及大部分氨基酸的合成场所。近年来,由于重组 DNA 和基因工程等现代分子生物学技术的应用,包括用限制性内切酶绘制物理图谱、基因定位、分离、扩增和鉴定,以及 DNA 序列快速分析法,完成了多种植物叶绿体基因组的全序列测定,并研究了这些基因的结构、功能与表达。

叶绿体基因组的研究不仅有助于在分子水平上研究光合作用、叶绿体的起源与进化、核质互作关系,而且通过对叶绿体的遗传转化可以改良叶绿体的功能,从而创造出有价值的作物新品种^[5-6]。

1 棉花叶绿体基因组

大部分叶绿体基因组都是共价闭合的双链环状分子,少数为线性分子。植物的叶绿体 DNA (cpDNA)长度一般为 120~160 kb^[7],最显著的特征是具有 2 个反向重复序列(inverted repeat, IR),其长度约为 6~76 kb,在 2 个 IR 之间有一个小单拷贝区(small single-copy region, SSC)和一个大单拷贝区(large single-copy region, LSC),前者长度约为 20 bp,后者约 80 bp。不同植物的叶绿体大小不同,这些不同首先表现在 IR

收稿日期:2009-09-23 作者简介:江媛(1985-),女,硕士研究生;* 通讯作者,jianingyucn@yahoo.com.cn

基金项目:转基因生物新品种培育(2008ZX08005-002)

区,其次是 SSC。

棉花叶绿体基因组的测序工作 2006 年已经完成,Genbank 序列号 DQ345959^[8]。完整的棉花叶绿体基因组有 160301 bp, 分为一对 25608 bp 长的 IR 区,88816 bp 的 LSC 和 20269 bp 的 SSC (图 1),共有 131 个基因,即 112 个单基因和 19

个位于 IR 区的重复基因。7 种 tRNA 基因和所有的 rRNA 基因存在于 IR 区,且有 17 个基因包含内含子,缺少 *rpl*22 和 *int*A 基因^[8]。棉花的整个叶绿体基因组上,TA 含量达 62.75%,GC 含量为 37.25%。蛋白质编码基因占 56.46%,非编码区(包括内含子和基因间隔区)占 43.54%。

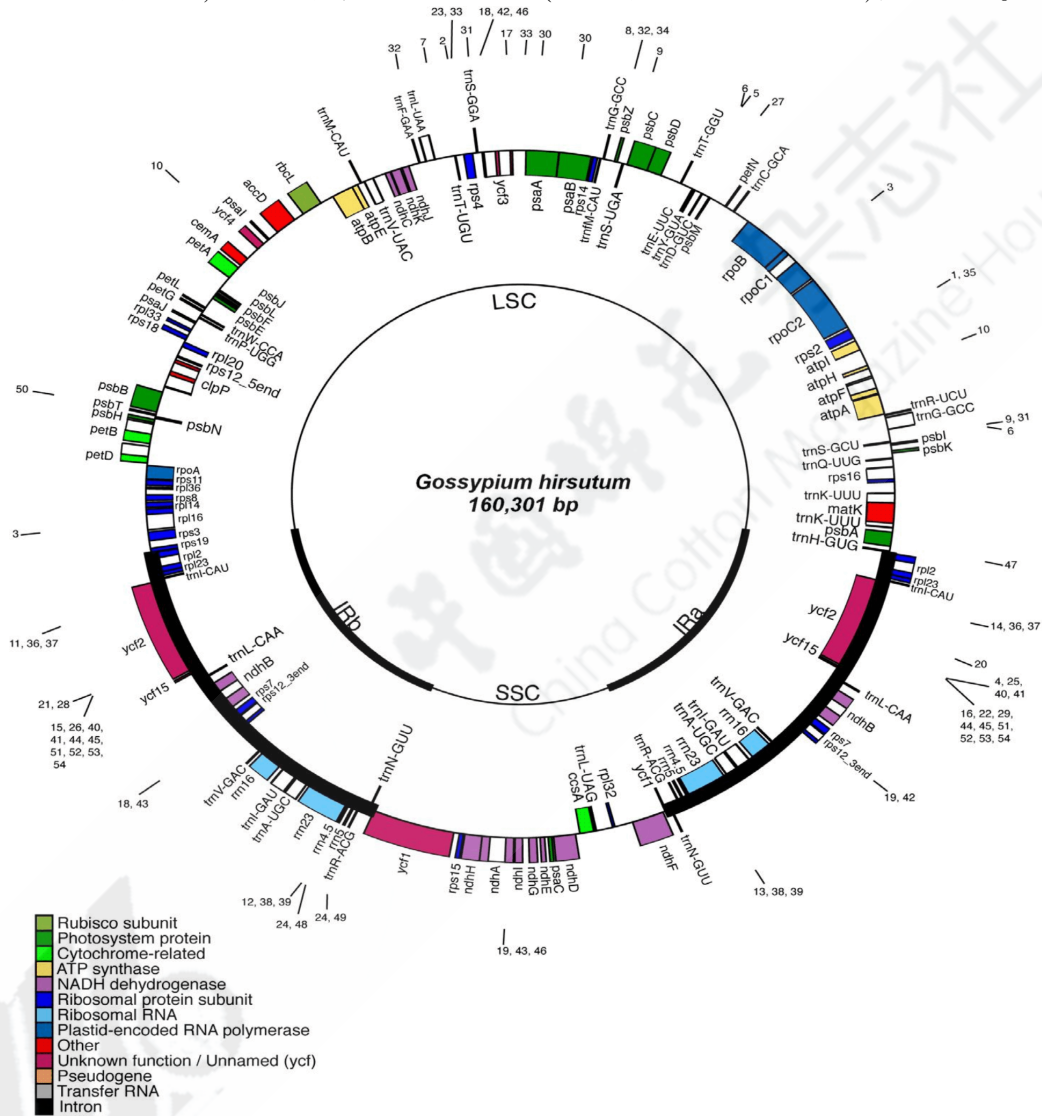


图 1 棉花叶绿体基因组图谱^[8]

Fig. 1 Gene map of the *Gossypium hirsutum* chloroplast genome^[8]

棉花 cpDNA 有相对较长的 LSC 和 SSC,原因是 LSC 和 SSC 区的基因间隔区和内含子的扩张。内含子的分类取决于内含子的保守边界序列,这些序列在内含子的拼接、RNA 的折叠过程中起重要作用^[9]。棉花 cpDNA 的内含子的边界序列与其它高等植物有高度的同源性,除了 *trn*L(UAA)属于类群 I 型内含子外,其它内含子都属于自拼接类群 II 型。在棉花 17 个包含内含子的基因中,15 个只含 1 个内含子,2 个(*clp*P,*ycf* 3)

包括 2 个内含子。这 17 个基因有 11 个定位在 LSC 区,而且它们的内含子均比烟草、拟南芥、菠菜等其它 8 种双子叶植物长;有 5 个基因定位在 IR 区,其中 4 个基因[*rpl* 2, *ndh*B, *trn* I(GAU) 和 *trn*A(UGC)]的内含子比烟草长,只有 3' *rps*12 的内含子大小与烟草相同;仅有 *ndh*A 定位在 SSC 区,它的内含子很短,这也意味着棉花 SSC 区的增长是由于基因间隔区的增长引起的。LSC 和 SSC 的内含子与基因间隔区的差异与先前的研

究结果相同,LSC 和 SSC 的进化趋异速度比 IR 高 3 倍^[10-11]。

分析棉花叶绿体基因组的重复序列发现,它有 30 段直接重复和 24 段反向重复,而且这些重复序列的长度多是 30 bp(23 段直接重复和 15 段反向重复长度都在 30~40 bp)或更长,且一致性均达 90%以上。大部分直接重复基因是参与光合作用的叶绿体基因,它们多位于基因间隔区、内含子序列或 *ycf2* 中^[12]。有趣的是,棉花的重复序列还存在于除上述 3 种序列以外的区域,如:在 *psaA* 和 *psaB* 2 个基因中有一段长达 72 bp 的直接重复;*rnm23* 基因中有一段 34 bp 的直接重复;*trnS-GCU* 和 *trnS-UGA* 中有一段 32 bp 的直接重复^[8]。

2 棉花叶绿体基因的克隆及功能研究

根据已测定的叶绿体 DNA 序列,推测叶绿体基因组大约可编码 120 个以上的基因,这些基因大致可分为 3 大类^[13]:第一类是与转录和翻译有关的基因,也称遗传系统基因;第二类是与光合作用有关的基因,也称光合系统基因;第三类是与氨基酸、脂肪酸、色素等物质的生物合成有关的基因,也称生物合成基因。

近年来,随着分子生物学的发展和対光合作用研究的不断深入,已有部分叶绿体基因和基因的调控元件被克隆和应用。樊卫华等从棉花叶绿体基因组中分别克隆获得了完整的 NADH 脱氢酶 ND2 亚基基因 *ndhB*^[14]和叶绿体核糖体小亚基 S7 蛋白基因 *rps7*^[15],并且探讨了其结构与演化。棉花叶绿体 *ndhB* 片段全长为 2165 bp,包括 *ndhB* 基因的编码序列、内含子及侧翼序列。其中,*ndhB* 基因编码区全长 1125 bp,由 2 个长度分别为 408 bp 和 717 bp 的外显子构成,内含子长 669 bp,两侧具有保守的边界序列:5'-GTGYGRY 和 3'-RYCNAYYYYNAY,这符合叶绿体第三类内含子的边界特征。5' 端还有一个保守的 -10 区 TATGATT 和 SD 序列 TGA,它与烟草、水稻的相应基因具有很高的同源性,分别达 98.5% 和 95.3%。棉花叶绿体 *rps7* 片段全长 1010 bp,包括编码区和侧翼序列,与烟草、水稻的相应序列的同源性分别达 97.9% 和 89.5%,编码区内只有一

些碱基的替换;非编码区内的保守性也很高,只有几个碱基的插入和缺失。此外,1993 年 David M A 等克隆到棉花叶绿素 a/b 结合蛋白基因,分别命名为 Lhcb1.1 和 Lhcb3.1,结构分析显示 Lhcb1.1 不含内含子,而 Lhcb3.1 含有 2 个内含子,杂交分析证实这 2 个基因均有较高的拷贝数。Giannasi D E 等克隆了棉花 RUBP 羧化酶的大亚基(*rbcl*),基因长 1409 bp,编码 469 个氨基酸。Crom R E 等克隆 NADH 脱氢酶第五条链编码基因,还克隆几个叶绿体的氨基酸转运酶的基因。Saglicocco 等克隆了棉花 RUBP 羧化酶的小亚基(*rbcS*)基因。上述研究表明,国内外已经克隆了一些叶绿体基因,特别是光合作用系统中的基因,但从目前的研究情况来看,对一些基因详细功能及调控机制的研究还有待深入。

3 棉花叶绿体 RNA 编辑

随着棉花叶绿体基因组测序工作的完成及功能基因的研究,叶绿体 RNA 编辑现象也引起了人们的关注。RNA 编辑是指转录后 RNA 成熟过程中核苷酸的替换、插入与缺失现象^[16],广泛存在于各种生物体中,高等植物的 RNA 编辑现象发生在叶绿体、线粒体中,大部分是 C→U 的转换^[17]。近年来,在烟草^[18-19]、拟南芥^[20-21]、颠茄^[22]、水稻^[23]、黑松^[24]等种植物的叶绿体基因组中均发现 RNA 编辑现象。目前认为叶绿体 RNA 编辑可能参与基因表达调控,编辑可使一个基因产生不同的蛋白^[25],这可能是生物在长期进化过程中形成的有效扩展原有遗传信息的方式。其次,RNA 编辑能提高同源基因的氨基酸保守性^[26-27],而这些保守的氨基酸是蛋白质的正确折叠和功能的实现所必需的。因此,编辑通常也被认为是转录水平上的修复机制,用于恢复因 DNA 突变而改变的遗传信息;此外,编码区的编辑在一定程度上还能提高转录本的稳定性和编码蛋白的疏水性。一般情况下,编辑会造成疏水性氨基酸的增加,这可能会影响叶绿体功能基因的正确翻译和表达,进而可能会通过影响蛋白质的结构而影响其活性^[28]。

在比较棉花叶绿体编码基因的核苷酸序列与 Genebank 上的 EST 序列时发现,*rps16*、

rpo C2、*rps 4* 和 *ycf* 与它们各自的 EST 序列的一致性达 100%，而 *rpl 23*、*rpl 20*、*ndhC*、*rps 3* 和 *clpP* 与它们的 EST 序列比较时却发现，共有 11 个非同义的核苷酸取代，导致 8 种氨基酸的改变，在这 11 个取代中有 2 个是 C→U 的转换^[8]，推测棉花叶绿体基因中可能会有 RNA 编辑现象存在。我们根据已经测定的烟草、拟南芥的叶绿体 RNA 编辑位点，利用 Clustal W 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) 对棉

花的 78 个功能基因进行编辑位点的预测，结果在棉花的 29 个转录本中预测出 58 个编辑位点 (表 1)，其中氨基酸由亲水性向疏水性改变的有 44 个，频率高达 75.9%，而且有 30 个是丝氨酸转变为亮氨酸，这种转变类型的频率最高，其次是有 9 个脯氨酸转变成亮氨酸；另外，编辑发生在密码子第二位的有 51 个，频率高达 87.9%，相关的验证实验正在进行。

表 1 棉花叶绿体基因组 RNA 编辑位点的预测

Table 1 The prediction of cotton chloroplast genome RNA editing sites

基因	密码子位置	密码子及氨基酸变化	基因	密码子位置	密码子及氨基酸变化
<i>ndhA</i>	114	uCa(S)→uUa(L)	<i>rpoB</i>	113	uCu(S)→uUu(F)
	189	uCa(S)→uUa(L)		184	uCa(S)→uUa(L)
<i>ndhB</i>	50	uCa(S)→uUa(L)	189	uCg(S)→uUg(L)	
	156	cCa(P)→cUa(L)	809	uCa(S)→uUa(L)	
	181	aCg(T)→aUg(M)	<i>rpo C1</i>	21	uCa(S)→uUa(L)
	196	Cau(H)→Uau(Y)		421	Ccg(P)→Ucg(S)
	204	uCa(S)→uUa(L)	<i>rpo C2</i>	1004	aCc(T)→aUc(I)
	246	cCa(P)→cUa(L)		<i>accD</i>	271
	249	uCu(S)→uUu(F)	474	cCu(P)→cUu(L)	
	277	uCg(S)→uUg(L)	<i>clpP</i>	108	gCc(A)→gUc(V)
	279	uCa(S)→uUa(L)		187	Cau(H)→Uau(Y)
	419	Cau(H)→Uau(Y)	<i>mat K</i>	124	Cau(H)→Uau(Y)
494	cCa(P)→cUa(L)	310		uCu(S)→uUu(F)	
<i>ndhC</i>	108	uCa(S)→uUa(L)	413	Cac(H)→Uac(Y)	
<i>ndhD</i>	1	aCg(T)→aUg(M)	<i>petL</i>	2	cCu(P)→cUu(L)
	128	uCa(S)→uUa(L)		<i>rps 2</i>	45
	225	uCa(S)→uUa(L)	83		uCg(S)→uUg(L)
	293	uCa(S)→uUa(L)	109		Ccc(P)→Ucc(S)
	433	uCa(S)→uUa(L)	<i>rpl 20</i>		103
	437	uCa(S)→uUa(L)		<i>rps12</i>	74
<i>ndhE</i>	78	uCa(S)→uUa(L)	<i>rps14</i>	27	uCa(S)→uUa(L)
<i>ndhF</i>	97	uCa(S)→uUa(L)	<i>rps18</i>	74	uCg(S)→uUg(L)
<i>ndhG</i>	17	uCg(S)→uUg(L)		<i>atpA</i>	305
<i>psbF</i>	26	uCu(S)→uUu(F)	383		uCa(S)→uUa(L)
	<i>psaI</i>	28	uCu(S)→uUu(F)	<i>atpF</i>	31
<i>psbJ</i>	20	cCa(P)→cUa(L)	<i>atpI</i>		207
	<i>psbN</i>	10	uCu(S)→uUu(F)	<i>ycf1</i>	9
<i>rpoA</i>	112	gCa(A)→gUa(V)	<i>ycf2</i>	665	uCg(S)→uUg(L)
	279	uCa(S)→uUa(L)		1162	cCa(P)→cUa(L)

注：密码子中的大写字母表示编辑的靶核苷酸；括号中的字母代表编辑前后的氨基酸。

4 棉花叶绿体的遗传转化研究

自细胞核转基因棉花种植推广以来，棉花产量和品质都有了较大幅度的改善。但随着研究的深入，人们逐渐认识到细胞核转基因技术有其难以克服的缺点，例如核基因组较大、遗传背景复杂、外源基因难以控制等，因此，叶绿体转化正成为继核转化之后的一项非常有效的新技术。与核基因技术相比，叶绿体转化具有明显优势，主要

表现在：(1)表达效率高且外源基因可以定点整合^[29]；(2)可以直接表达来自原核的功能基因；(3)多基因可以同时转化，提高了转化效率^[30]；(4)没有载体序列^[31]、位置效应^[32]和多效性^[33]；(5)没有核转化中经常出现的基因沉默现象^[34]；(6)属于母性遗传，后代材料稳定^[35]；(7)可有效控制花粉漂移造成的基因污染，环境安全性高。

叶肉细胞中的叶绿体拷贝数达上万个。在利

用叶绿体作为遗传转化的载体时,一旦外源基因插入到 IR 区,叶绿体本身就会在对应的重复区域内自动调整拷贝数,可以提高表达效率,表达的目的蛋白占可溶性蛋白的比例高达 46.1%^[36],所以叶绿体非常适合遗传转化。在叶绿体转基因研究中,转化效率是非常重要的因素,转化烟草的“通用载体”(pLD CtV)在土豆和西红栊上也获得了成功,但转化效率非常低。在土豆的 104 个外植体中只有 3 个转化成功,其中 2 个是嵌合的转化愈伤^[37];在西红栊的 520 个外植体中只获得了 6 个转化成功的愈伤组织^[38]。

棉花叶绿体转化的主要挑战是研发出在绿色和非绿色质体中都起作用的合适的调控序列、选择标记以及通过体细胞胚胎发生产生同步化质体的转基因植株。直到 2004 年,Kumar 等^[39]通过叶绿体同源重组,用棉花特异性的叶绿体转化载体转化棉花胚性愈伤,将标记基因和调控序列整合到叶绿体基因组的 16S/trnI-trnA/23S 区,获得了稳定的棉花重组转化质体,且体外产生的叶绿体转基因株系与非转基因株系在相同条件下培养,它们的开花、棉铃的形成和种子成熟都没有任何异常。实验中的特异转化载体包含 2 个选择标记基因 *aphA-6* 和 *npt I*, 它们都有各自的调控序列,确保在各种条件下,对卡那霉素都有持续抗性,使得双选择标记基因的转化效率达单选择标记基因的 8 倍。其次,载体采用了加长的同源序列,因为有研究表明,同源重组的侧翼序列越长,同源性越高,重组率也越高^[40]。棉花特异载体的侧翼序列是从 cpDNA 扩增得到的 4.0 kb 的 DNA 片段,这是以前使用的通用转化载体序列长度的 2 倍,明显提高了棉花叶绿体的转化效率,是棉花叶绿体转化的重大突破。但转化后较高的细胞死亡率和损伤位点酚类化合物的产生明显降低了转化效率。此外,转化后的前质体在选择压力下发展成同步化的叶绿体还存在困难,因此,棉花叶绿体转化技术还有待进一步改进。

5 展望

我国是棉花生产和消费大国,棉花和纺织品是我国出口创汇的支柱产业之一,棉花生产在我国的国民经济中占有举足轻重的地位。然而,有限的耕地面积制约着我国棉花产业的发展,急需

培育出优良的棉花新品种。随着棉花叶绿体基因组测序工作的完成,以及 cpDNA 的一些性状和结构了解的清晰化,外加生物技术的迅速发展,有必要对棉花叶绿体基因组进行深入研究。

叶绿体 RNA 编辑可能参与基因的表达调控和影响蛋白结构。因此,在完成棉花叶绿体 RNA 编辑位点预测的基础上,开展棉花叶绿体 RNA 编辑位点的测定工作,研究 RNA 编辑对基因功能的影响,有助于加深对棉花叶绿体光合作用分子机制的了解。

目前,我国棉花育种方面的研究工作主要集中在对核基因组的研究,对棉花叶绿体遗传转化方面的研究还不够深入。作为生物改良的有效手段,叶绿体遗传转化能为棉花的抗逆性、产量以及纤维品质等改良及其它领域开创新机遇,尤其是在生物安全方面有明显优势^[41]。因而,加强棉花叶绿体基因转化技术的研究,对育种工作的发展有广泛的前景和深远意义。

参考文献:

- [1] FRYXELL P A. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae)[J]. *Rheedea*, 1992, 2: 108-165.
- [2] ENDRIZZI J E, Turcotte E L, Kohel R J. Genetics, cytology, and evolution of *Gossypium*[J]. *Advances in Genetics*, 1985, 23: 271-375.
- [3] WENDEL J F. New World tetraploid cottons contain Old World cytoplasm[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 4132-4136.
- [4] STEWART J Mc D. Potential for crop improvement with exotic germplasm and genetic engineering [M]// CONSTABLE G A, Forrester N W. Challenging the future. Proceedings of the World Cotton Research Conference-1. Melbourne, Australia: CSIRO, 1995: 313-327.
- [5] MALIGA P. Towards plastid transformation in flowering plants [J]. *Tibtech*, 1993(11): 101-1071.
- [6] DEWITT N. Lighting up transplastomics[J]. *Nature Biotechnol*, 1999(17): 8401.
- [7] PALMER J D1. Comparative organization of chloroplast genome [J]. *Annu Rev Genet*, 1985, 19: 325-354.
- [8] LEE S, Kaittanis C, Jansen R, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Gossypium hirsutum*: organization and phylogenetic relationships to other angiosperms [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7: 61.
- [9] IBRAHIM R I H, Azuma J I, Sakamoto M. Complete nucleotide sequence of the cotton (*Gossypium barbadense* L.) chloroplast genome with a comparative analysis of sequences among 9 dicot plants[J]. *Genes & genetic Systems*, 2006, 81: 311-321.
- [10] MAIER R M, Neckermann K, Igoi G L, et al. Complete se-

- quence of the maize chloroplast genome: Gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing[J]. *J Mol Bio*, 1995, 251: 614-628.
- [11] SUGIURA M. The chloroplast genome[J]. *Essays Biocgem*, 1995, 19: 49-57.
- [12] DRESCHER A, Ruf S, Calsa T Jr, et al. The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes[J]. *Plant Journal*, 2000, 22: 97-104.
- [13] RAGHYENDRA A S. Photosynthesis : a comprehensive treatise [M]. London: Cambridge Univ Press, 1998: 172-86.
- [14] 樊卫华, 程奇, 任延国, 等. 棉花叶绿体 *NdhB* 基因的克隆和序列分析[J]. *农业生物技术学报*, 1995, 3(4): 89-93.
FAN Wei-hua, Cheng qi, Ren Yan-guo, et al. Cotton chloroplast *NdhB* Cloning and sequence analysis[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1995, 3 (4): 89-93.
- [15] 樊卫华, 沈燕新, 张中林, 等. 棉花叶绿体 70s 核糖体 S7 蛋白基因的克隆和序列分析[J]. *作物学报*, 1997, 23(4): 487-490.
FAN Wei-hua, Shen Yan-xin, Zhang Zhong-lin, et al. Cotton chloroplast 70s ribosomal S7 protein gene cloning and sequence analysis[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1997, 23(4): 487-490.
- [16] BRENNICKE A, Marchfelder A, Binder S. RNA editing [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999, 23: 297-316.
- [17] SHIKANAI T. RNA editing in plant organelles: Machinery, physiological function and evolution[J]. *Cell Mol: Life Sci*, 2006, 63: 698-708.
- [18] HIROSE T, Kusumegi T, Tsudzuki T, et al. RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast polymerase activity[J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 262: 462-467.
- [19] SASAKI T, Yukawa Y, Wakasugi T, et al. A simple *in vitro* RNA editing assay for chloroplast transcripts using fluorescent dideoxynucleotides: distinct types of sequence elements required for editing of *ndh* transcripts[J]. *The Plant Journal*, 2006, 47: 802-810.
- [20] LUTZ K A, Maliga P. Lack of conservation of editing sites in mRNAs that encode subunits of the NAD (P)H dehydrogenase complex in plastids and mitochondria of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Curr Genet*, 2001, 40: 241-249.
- [21] TILLICH M. Editing of plastid RNA in *Arabidopsis thaliana* ecotypes[J]. *Nature Biotechnol*, 2005, 43: 708-715.
- [22] SCHMITZ-Linneweber C, Regel R, Du T G, et al. The plastid chromosome of *Atropa belladonna* and its comparison with that of *Nicotiana glauca*: the role of RNA editing in generating divergence in the process of 637 plant speciation[J]. *Mol Biol Evol*, 2002, 19: 1602-1612.
- [23] COMEILLE S, Lutz K, Maliga P. Conservation most editing events dispensable[J]. *Mol Gen Genet*, 2000, 264: 419-424.
- [24] WAKASUGI T, Hirose T, Horihata M, et al. Creation of novel protein-coding region at the RNA level in black pine chloroplasts: the pattern of editing in gymnosperm chloroplast is different from that in angiosperms[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 8766-8770.
- [25] HANSON M R, Sutton C A, Lu B. Plant organelle gene expression: altered by RNA editing[J]. *Trends Plant Sci*, 1996, 1(2): 57-64.
- [26] MAIER R M, Zeltz P, Lossel H, et al. RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts[J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 32: 343-5.
- [27] GRAY M W. RNA editing in plant organelles: a fertile field[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 8157-8159.
- [28] YURA K, Go M. Correlation between amino acid residues converted by RNA editing and functional residues in protein three-dimensional structures in plant organelles[J]. *BMC Plant Biology*, 2008, 8:79.
- [29] DANIELL H, Dhingra A. Multigene engineering: dawn of an exciting new era in biotechnology[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13: 136-141.
- [30] RUIZ O N, Hussein H, Terry N, et al. Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering[J]. *Plant Physiol*, 2003, 132: 1344-1352.
- [31] DANIELL H, Khan M S, Allison L. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology[J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 84-91.
- [32] 李宏韬, 赵淑青, 赵彦修, 等. 叶绿体基因工程简介[J]. *遗传*, 2003, 25 (4): 495-498.
LI Hong-tao, Zhao Shu-qing, Zhao Yan-xiu, et al. The introduction of chloroplast gene engineering[J]. *Hereditas*, 2003, 25(4): 495-498.
- [33] LEE S B, Kwon H B, Kwon S J, et al. Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance [J]. *Mol Breeding*, 2003, 11: 1-13.
- [34] DECOSA B, Moar W, Lee S B, et al. Overexpression of the *Bt Cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals [J]. *Nature Biotechnol*, 2001, 19: 71-74.
- [35] DANIELL H. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops[J]. *Nature Biotechnol*, 2002, 20: 581-586.
- [36] GREVICH J J, Daniell H. Chloroplast genetic engineering: recent advances and future perspectives[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2005, 24: 83-107.
- [37] SIDOROV V A, Kasten D, Pang S Z, et al. Technical advance: stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker[J]. *Plant Journal*, 1999, 19: 209-216.
- [38] RUF S, Hermann M, Berger I, et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit[J]. *Nature Biotechnol*, 2001, 19: 870-875.
- [39] KUMAR S, Daniell H. Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes[J]. *Plant molecular Biology*, 2004, 56: 203-216.
- [40] FUJITANI Y, Yamamoto K, Kobayashi I. Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length [J]. *Genetics*, 1995, 140: 797-809.
- [41] RUF S, Karcher D, Bock R. Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(17): 6998-7002. ●