

叶绿体遗传转化系统及其应用进展

刘佳音, 李儒剑, 齐双慧, 孙艳君, 尹晓佳, 米铁柱, 李继明^{*} (青岛海水稻研究发展中心, 山东青岛 266000)

摘要 叶绿体遗传转化系统是独立于细胞核遗传转化系统之外的转化系统, 为植物导入外源基因提供了新的途径。叶绿体转化具有细胞核转化所没有的优点, 随着叶绿体遗传转化技术的发展及应用, 其优越性也逐渐得到认同。从叶绿体转化系统的原理、发展历程、特点以及叶绿体转化的方法及其应用领域等方面进行总结, 并对其未来的研究进行展望。

关键词 叶绿体遗传转化; 基因枪; 母系遗传; 定点整合

中图分类号 Q 943 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)06-0016-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.06.005

开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

Chloroplast Genetic Transformation System and Its Application Progress

LIU Jia-yin, LI Ru-jian, QI Shuang-hui et al (Qingdao Saline-alkali Tolerant Rice Research and Development Center, Qingdao, Shandong 266000)

Abstract Chloroplast genetic transformation system is independent of nuclear genetic transformation system, which provides a new approach for plants to intergrate exogenous genes. Chloroplast transformation has advantages not found in nuclear transformation. With the development and application of chloroplast genetic transformation technology, its advantages are gradually recognized. The principles, development process, characteristics, methods and application fields of chloroplast transformation system were summarized, and its future research was prospected.

Key words Chloroplast genetic transformation; Gene gun; Maternal inheritance; Site-specific expression

自 1983 年烟草转基因成功以来^[1], 以转基因为代表的植物基因工程在农业、制药工程等领域掀起了一场变革。然而, 随着研究的不断深入, 研究人员逐渐认识到核转化技术存在着一些难以克服的缺点, 较大的细胞核基因组、复杂的遗传背景使得外源基因的插入整合位点及拷贝数难以控制和预测, 造成转化子中外源基因表达效率低下且在后代中不能实现稳定遗传, 同时容易出现各种位置效应以及基因沉默、基因失活现象。再者, 外源基因随花粉飘散而发生漂移, 环境安全难以保证等^[2]。叶绿体遗传转化系统则弥补了核转化的缺陷。叶绿体(chloroplast)属于质体(plastid)的一种, 广泛存在于植物和真核藻类的细胞中, 是细胞进行光合作用的主要场所。叶绿体是半自主细胞器, 其基因组与原核生物类似, 每个细胞中含有 10~100 个不等的、大小在 120~160 kb 的裸露双链闭合环状 DNA, 一般由一对反向重复序列和大单拷贝区、小单拷贝区组成, 每个叶绿体中基因组以成千上万个拷贝的形式存在, 内部碱基分布不均匀, 功能相关的基因多以“多顺反子”形式存在^[3]。高等植物叶绿体基因组编码 100 个左右的基因, 与大约 3 000 个核编码蛋白一起, 构成了叶绿体的转录、翻译系统, 进行包括光合作用、氨基酸和脂肪酸生物合成等在内的复杂新陈代谢过程^[4]。早在 1988 年, Boynton 等^[5]利用基因枪轰击法实现了外源基因导入单细胞藻类的叶绿体, 此后在种子植物烟草中也实现了叶绿体稳定遗传转化^[6]。叶绿体转化技术相对于核转化技术而言, 目的基因表达极为高效, 而且没有位置效应, 不会产生基因沉默现象, 同时其多顺反子表达、母性遗传和安全性高

的特点, 使其在基础研究和应用生物技术领域展现了极高的价值, 除烟草外, 番茄^[7]、马铃薯^[8]、大豆^[9]、莴苣^[10-11]和模式作物拟南芥^[12]等植物的叶绿体遗传转化也取得了成功。笔者从叶绿体转化技术系统的原理、特点、发展历程及其应用领域等方面进行总结。

1 叶绿体遗传转化系统的原理和发展

1.1 叶绿体遗传转化系统的原理 叶绿体是绿色植物及真核藻类进行光合作用的场所, 光合作用合成的有机物是整个生物界最基本的能量来源。叶绿体通过光合作用实现氧气生产、碳固定以及淀粉合成, 同时进行氨基酸、脂肪酸合成等重要生物反应^[13]。高等植物叶绿体基因组大小在 120~160 kb, 在每个细胞中含有 1 000~10 000 个拷贝^[14], 一般典型的陆生植物的叶绿体基因组含有 110~120 个基因^[15]。叶绿体是半自主性细胞器, 受细胞核的控制, 同时也能进行自我复制, 大多数被子植物叶绿体的遗传为母系遗传, 因此非常适合转化。

叶绿体转化系统主要采用同源重组机制和位点特异性整合 2 种方式进行转化^[16]。同源重组方式是通过同源重组, 将目的 DNA 片段特异性插入到叶绿体基因组的某一位点中, 该技术的原理是在载体构建过程中于外源 DNA 片段两侧连接一段与受体叶绿体基因组插入位点两侧片段同源的 DNA 序列, 载体导入叶绿体后, 目的 DNA 两侧的同源片段与叶绿体基因组发生同源重组, 目标片段特异性整合到叶绿体基因组中的设计插入位点中。外源基因的位点特异性插入既不会造成叶绿体基因组序列的丢失和破坏, 又不会影响原有基因的功能, 避免了位置效应, 有利于基因的稳定遗传和表达。噬菌体 phiC31 介导的位点特异性整合法主要基于特异性整合酶(INT)能够介导噬菌体 attP 与细菌 attB 位点之间整合的原理^[17], 首先通过同源重组将细菌 attB 位点整合到叶绿体基因组的特定位点中, 之后以该转基因株系为下一

基金项目 山东省重点研发计划项目(2017CXGC0312); 青岛市民生科技计划项目(18-6-115-nsh); 青岛市科技计划项目(18-1-2-13-zhc)。

作者简介 刘佳音(1978—), 女, 甘肃永昌人, 硕士, 从事水稻耐盐碱育种研究。*通讯作者, 助理研究员, 博士, 从事耐盐碱水稻及杂交水稻育种工作。

收稿日期 2019-07-08; **修回日期** 2019-11-27

步遗传转化的受体,在 INT 酶的介导下实现带有 attP 位点的质粒与叶绿体基因组中 attB 位点的整合,将目的基因插入到叶绿体基因组中^[18],这种方法提高了外源基因向叶绿体基因组的整合效率。

1.2 叶绿体遗传转化系统的发展 叶绿体转化技术的研究瓶颈往往在如何将目的基因定向导入叶绿体和如何实现同质化上。叶绿体基因组以多拷贝的形式存在于植物叶绿体中,目前还没有办法实现通过一次性操作使所有叶绿体基因组带有目的基因。在进行遗传转化前降低叶绿体基因组的拷贝数或选择致死型突变体进行遗传转化能够在一定程度上提高叶绿体转化的成功率,但实现同质化最常用的方法为高筛选压下的多代筛选,因此确定合适的筛选标记基因对叶绿体转化的同质化进程非常关键。Michel 等^[19]将 *aadA* 基因作为筛选标记基因进行衣藻叶绿体转化,获得的衣藻转化子具备壮观霉素和链霉素抗性;Svab 等^[20]将 16SrRNA 的突变体基因作为转化烟草叶绿体的筛选标记用于叶绿体转化中的抗性筛选,获得的再生植株表现出对链霉素的抗性;Huang 等^[21]报道了基因 *aphA6* 为卡那霉素抗性基因。尽管抗生素筛选标记基因的应用已日趋成熟,但也存在很大的弊端。为了解决这一问题,科学家在叶绿体转化研究中探索了一系列非抗生素抗性基因用作筛选标记。Daniell 等^[22]在叶绿体遗传转化中将菠菜中的甜菜碱醛脱氢酶基因作为筛选标记基因;细菌的 *Bar* 基因、 β -葡萄糖醛酸酶基因(*GUS*)、氯霉素乙酰基转移酶基因(*CAT*)和绿色荧光蛋白基因(*GFP*)作为报告基因也用于叶绿体的遗传转化中,其中绿色荧光蛋白基因(*GFP*)表达产生的绿色荧光蛋白可以直接在活体中进行检测。

叶绿体转化应用广泛,科研人员正致力于在模式植物及重要农作物中实现叶绿体遗传转化。然而叶绿体转化在植物中的实现和推广非常困难,仅有少数离体培养存活性和再生性较好的植物获得了转化植株,包括几种茄科植物、莴苣、杨树等^[23-24]。对模式植物拟南芥而言,叶绿体转化后的再生植株常表现雄性不育或雌性不孕,尽管有的研究在一定程度上提高了拟南芥叶绿体转化的效率,但育性问题尚未解决^[25]。

2 叶绿体遗传转化系统的特点

叶绿体转化技术与核转化技术相比具有以下多方面的优点。

2.1 定点整合、表达高效 在叶绿体遗传转化载体构建过程中,根据设计的同源片段,能够实现外源基因在叶绿体基因组上的定点插入,这避免了核转化中外源基因的随机整合造成的位置效应、基因沉默以及顺式失活等问题。此外,由于叶绿体基因组在叶绿体中以较高拷贝数形式存在,相应地,外源基因整合到叶绿体基因组后也会有大量拷贝,极大提高了外源基因的表达量。

2.2 多顺反子表达 叶绿体基因的表达模式类似原核生物,一个启动子可以启动多个基因的转录,为多顺反子表达模式。这种表达模式为一次性转化多个基因提供了可能。

2.3 遗传稳定、安全性高 经过叶绿体转化获得的再生植株,外源基因随叶绿体基因组进行母性遗传,因此后代性状不会发生分离,使得这种纯系能够一直保持。另外,外源基因不会存在于花粉中,不存在花粉漂移的现象,避免了转基因对环境带来的污染。所以在转基因生物安全的角度上,叶绿体遗传转化的产物不存在外源基因随花粉扩散的风险,是符合安全要求的。

2.4 便于操作,对细胞影响小 叶绿体基因组小、结构简单,同时,由于叶绿体双层脂质膜的存在使外源基因表达的外源蛋白不会释放到细胞质基质中,避免了外源基因表达对细胞造成的不利影响。

3 叶绿体转化的方法

将外源基因导入叶绿体的常用方法包括基因枪法、聚乙二醇(PEG)介导转化法、花粉管导入法、显微及激光注射法以及纳米基因载体介导的遗传转化法等。

3.1 基因枪法 利用基因枪进行遗传转化的方法开始于 20 世纪 80 年代,基因枪的出现促进了核转基因技术的发展,尤其是多基因共转化,同时基因枪转化也是叶绿体转化领域应用最多、最有效的方法。其原理是将外源 DNA 黏附在金属颗粒表面,然后在高压动力作用下将金属颗粒轰击受体细胞,实现外源 DNA 向细胞的导入。基因枪转化法不受物种与基因型限制,基因枪轰击后的植物组织可以迅速完成再生分化获得植株。目前报道的大多数叶绿体转化成功的案例都是通过基因枪转化法实现的。

Ruf 等^[26]结合对核基因的基因编辑技术,开发了一种高效稳定的叶绿体转化方法,该研究首先通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术敲除核基因组中的一个抑制叶绿体基因翻译的基因 *ACC2*,获得的植株在叶绿体转化过程中对奇霉素抗性的敏感性增强;利用靶向拟南芥叶绿体载体 pCH8,通过基因枪转化根系愈伤组织,奇霉素筛选,获得了叶绿体转基因植株,且通过与野生型的正反交试验发现奇霉素抗性能够通过母性遗传在后代中保留。但有研究表明基因枪转化会对受体基因组造成破坏,包括染色体截短、大片段缺失和染色体断裂-融合-桥循环等损伤^[27]。

3.2 PEG 介导转化法 PEG 介导的原生质体转化法常作为基因枪转化法的替代方法^[28],该方法不受专利保护,不需要昂贵的设备,但对技术要求较高,更费时费力。该方法的原理是:除去细胞壁的植物细胞原生质体在 PEG 的作用下细胞膜结构发生重构,原生质体缩水,在细胞膜结构发生不可逆破坏前去除 PEG,则细胞膜结构将恢复原来的状态,外源 DNA 在这一过程中有机会进入植物细胞以及质体中,实现转化。PEG 介导的叶绿体遗传转化依赖于成熟的原生质体再生体系,目前已在烟草^[29]、番茄^[30]、花椰菜^[31]、莴苣^[32]等植物中取得成功。

3.3 花粉管导入法 *pabA* 基因是来源于龙葵的抗阿特拉津基因。刘博林等^[33]将含有 *pabA* 基因的 pBR322 质粒通过花粉管通道注入大豆子房中,得到的后代具有阿特拉津抗性。在后代的叶绿体中成功检测到 pBR322 DNA 的存在,但没有

证明外源基因是否整合在叶绿体基因组中。

3.4 显微及激光注射法 Weber^[34]报道了一种通过激光照射进行叶绿体转化的方法。将油菜离体叶绿体置于 DNA 溶液中并用波长为 343 nm 的激光照射,观察到叶绿体膜上出现了小洞并持续存在了 112 s;通过后续检测发现外源 DNA 已经进入到叶绿体中。该方法尽管能够实现将外源 DNA 向叶绿体中的导入,但利用激光照射法直接照射细胞、组织或器官进行叶绿体遗传转化的方法鲜见报道。

3.5 纳米基因载体介导的遗传转化 纳米材料具有化学、热力学性能稳定、粒径小、比表面积大等特性,可作为 DNA 甚至蛋白质的载体用于动植物遗传转化。纳米材料介导的遗传转化在动物中应用广泛,但由于植物细胞壁的存在使得该技术在植物遗传转化的应用中受到了一定限制。纳米基因载体与病毒载体不同,其没有毒性或毒性很低,容易被细胞接受,同时可通过对其表面官能团进行修饰,使其在基因运输过程中的靶向性增强^[35-36]。此外,与基因枪相比,纳米载体所能携带的分子不仅限于 DNA,可以实现 RNA、蛋白质等其他生物大分子的递送^[37]。纳米载体介导的遗传转化适用于大多数植物,且可以实现将生物大分子直接向植物成熟组织的递送,因此避免了繁琐的再生分化步骤。Torney 等^[38]报道了一种利用介孔二氧化硅纳米材料 (mesoporous silica nanoparticle, MSN) 向植物离体细胞或正常组织递送 DNA 的方法,通过将含有 GFP 的质粒装载到 MSN 系统中,并用纳米金材料包裹,利用基因枪轰击烟草子叶后,成功检测到了荧光信号。

Kwak 等^[39]在纳米材料向植物叶绿体中递送 DNA 的研究中取得了突破进展。利用一种由壳聚糖复合单壁碳纳米管 (chitosan-complexed single-walled carbon nanotubes, CS-SWNTs) 组成的纳米颗粒,将外源 DNA 定向地导入到植物叶绿体中,开创了叶绿体转化的新方法。该纳米材料携带正电荷,可松散结合带有负电荷的质粒 DNA,形成 pDNA-SWNT 复合物。pDNA-SWNT 复合物通过叶片气孔进入叶片内部,复合物在脂质交换膜渗透 (lipid exchange envelope penetration, LEEP) 机制下能够穿越细胞壁、细胞膜以及叶绿体的双层脂质膜,进入叶绿体中,在叶绿体基质的弱酸性环境下,质粒 DNA 释放并进一步表达。该方法不需要额外的试剂和设备,已经实现了外源 DNA 向芸芥、豆瓣菜、烟草和菠菜以及拟南芥叶肉原生质体叶绿体的递送和瞬时表达。

4 叶绿体转化系统的应用

自单细胞藻类及种子植物烟草实现了叶绿体稳定遗传转化以来,遗传转化技术在基础研究和应用生物技术研究领域展现了极高的价值,在为研究细胞内质体基因的表达调控和功能、核质互作提供了方法的同时,也为分子农业和作物改良开辟了新道路。

质体被称为植物细胞的“生物合成中心”,很多代谢反应在质体中进行。由于叶绿体具有很多优点,为叶绿体基因工程应用于作物性状改良提供了条件,并且已经实现了作物在抗除草剂^[40-41]、抗虫^[42]、抗病^[43]、耐盐^[44]等上的应用。将抗

虫基因转化叶绿体,能够实现其在叶绿体中的大量高效表达,Kota 等^[45]和 Cosa 等^[46]研究表明,在叶绿体转化中不需要对 *Cry* 基因的序列进行任何调整便可使其叶绿体中正常表达。Chakrabarti 等^[47]研究表明,质体中的 *Cry9Aa2* 基因表达的杀虫蛋白含量很高,但超过细胞质可溶蛋白的 10% 时,会对植物生长起抑制作用。刘青青^[48]又成功地将 *Cry* 基因导入到大豆和油菜中,这说明叶绿体转化技术在作物改良方面前景广阔。通过叶绿体转化将抗菌肽 *MSI299* 基因导入烟草中可使外源蛋白的表达量占到可溶性蛋白总量的 21.5% ~ 43.0%^[49]。将外源基因 *TPS1* 转化叶绿体后,植物体内产生的海藻糖含量比核转化技术提高了 25 倍^[50]。通过叶绿体转化提高烟草抗除草剂能力在烟草中已经获得成功,质体表达 *Bar* 基因蛋白可占到细胞可溶性蛋白的 7% 以上^[51]。叶绿体遗传转化系统以其众多的优点也在生物制药上得到越来越多的应用,尤其是在作为生物反应器进行食用结晶蛋白和人类药用蛋白的生产等方面^[52],目前为止已经用在生产疫苗类的霍乱毒素、破伤风毒素、动物疫苗等,医疗性蛋白如人类生长素、胰岛素类生长因子等中。

叶绿体转化系统的建立也为其自身研究和核质互作研究提供新方法,如叶绿体中核糖体的组装、叶绿体基因转录的研究以及叶绿体基因翻译的研究等方面。然而,叶绿体遗传转化系统也有其自身的缺点,限制了叶绿体转化系统的应用。

5 问题与展望

叶绿体转化系统建立于 20 世纪 80 年代,经过科学家的努力,近些年也取得了一些很大的发展,在拟南芥、油菜、水稻、马铃薯、生菜、胡萝卜等植物中均有相关研究,但在高等植物中仅在烟草中获得了稳定的转基因株系,叶绿体遗传转化技术之所以没有广泛应用于育种中主要原因如下:①叶绿体基因组序列信息的限制。目前具有完整的叶绿体基因组序列信息的植物非常少,大多数植物叶绿体基因组尚未测序,没有公开的基因组序列,在载体构建过程中无法确定用于外源基因的插入的同源片段。②组织培养体系的限制。选择合适的植物器官或组织片段作外植体是高效进行叶绿体遗传转化的一个关键方面。禾本科作物愈伤组织往往由幼穗或成熟胚经过诱导获得,如果利用愈伤组织进行叶绿体转化,用于遗传转化的愈伤组织中不含有成熟叶绿体,而是叶绿体的前体前质体,体积比叶绿体更小,更难以实现外源基因的导入,另外禾本科植物叶片较难进行脱分化和再分化,这也是叶绿体遗传转化较难进行的一个原因。③转化植株同质化方法的限制。如果要获得真正意义上的叶绿体转化体就意味着在每个拷贝的质体基因组中都必须有外源基因的存在。高效获得叶绿体转化事件的另一关键因素在于建立合适的筛选培养体系,采取相应手段促进高效筛选。目前采用的高筛选压进行多轮再生,以及在转化前降低受体细胞中叶绿体 DNA 拷贝数都是耗时长、操作复杂的过程。今后在一定时期内叶绿体转化迫切需要解决上述一系列问题。

随着对叶绿体遗传转化的研究深入以及新材料、新技术

在叶绿体转化中的应用,将很有可能作为一个重要工具用于植物研究,也将推动植物生物技术的进一步发展。

参考文献

- [1] ZAMBRYSKI P, JOOS H, GENETELLO C, et al. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity[J]. EMBO J, 1983, 2(12): 2143–2150.
- [2] 张景昱, 张中林, 苏宁, 等. 叶绿体遗传转化: 植物导入外源基因的新途径[J]. 植物学通报, 2001, 18(3): 288–294.
- [3] 刘良式. 植物分子遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 1–56.
- [4] YU Q, LUTZ K A, MALIGA P. Efficient plastid transformation in Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 2017, 175(1): 186–193.
- [5] BOYNTON J E, GILLHAM N W, HARRIS E H, et al. Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles[J]. Science, 1988, 240(4858): 1534–1538.
- [6] SVAB Z, MALIGA P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 913–917.
- [7] RUF S, HERMANN M, BERGER I J, et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit[J]. Nat Biotechnol, 2001, 19: 870–875.
- [8] VALKOV V T, GARGANO D, MANNA C, et al. High efficiency plastid transformation in potato and regulation of transgene expression in leaves and tubers by alternative 5' and 3' regulatory sequences[J]. Transgenic Res, 2011, 20: 137–151.
- [9] DUFOURMANTEL N, PELISSIER B, GARÇON F, et al. Generation of fertile transplastomic soybean[J]. Plant Mol Biol, 2004, 55: 479–489.
- [10] KANAMOTO H, YAMASHITA A, ASAO H, et al. Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids[J]. Transgenic Res, 2006, 15: 205–217.
- [11] RUHLMAN T, VERMA D, SAMSON N, et al. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression[J]. Plant Physiol, 2010, 152: 2088–2104.
- [12] SIKDAR S R, SERINO G, CHAUDHURI S, et al. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell Rep, 1998, 18: 20–24.
- [13] VERMA D, DANIELL H. Chloroplast vector systems for biotechnology applications[J]. Plant Physiol, 2007, 145(4): 1129–1143.
- [14] DANIELL H, COHILL P R, KUMAR S, et al. Chloroplast genetic engineering, in: molecular biology and biotechnology of plant organelles[M]. Netherlands: Springer, 2004: 443–490.
- [15] 黄冲, 吴乃虎. 叶绿体分子生物学研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 1990, 10(6): 24–29.
- [16] 钱雪艳, 杨向东, 郭东全, 等. 植物叶绿体遗传转化及研究进展[J]. 分子植物育种, 2008, 6(5): 959–966.
- [17] LUTZ K A, CORNEILLE S, AZHAGIRI A K, et al. A novel approach to plastid transformation utilizes the ϕ C31 phage integrase[J]. Plant J, 2004, 37: 906–913.
- [18] THORPE H M, SMITH M C. In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(10): 5505–5510.
- [19] MICHEL G. Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: A selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(15): 4083–4089.
- [20] SVAB Z, HAJDUKIEWICZ P, MALIGA P. Stable transformation of plastids in higher plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(21): 8526–8530.
- [21] HUANG F C, KLAUS S, HERZ S, et al. Efficient plastid transformation in tobacco using the ϕ A6–6 gene and kanamycin selection[J]. Mol Genet Genomics, 2002, 268(1): 19–27.
- [22] DANIELL H, MUTHUKUMAR B, LEE S. Marker free transgenic plants: Engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection[J]. Curr Genet, 2001, 39(2): 109–110.
- [23] SIDOROV V A, KASTEN D, PANG S Z, et al. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker[J]. Plant J, 1999, 19(2): 209–216.
- [24] OKUMURA S, SAWADA M, PARK Y W, et al. Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts[J]. Transgenic Res, 2006, 15(5): 637–646.
- [25] HIBBERD J M. A major advance in plastid transformation[J]. Plant Physiol, 2017, 175: 5.
- [26] RUF S, FORNER J, HASSE C, et al. High-efficiency generation of fertile transplastomic Arabidopsis plants[J]. Nat Plants, 2019, 5(3): 282.
- [27] LIU J, NANNAS N J, FU F, et al. Genome-scale sequence disruption following biolistic transformation in rice and maize[J]. Plant Cell, 2019, 31(2): 368–383.
- [28] 母连胜, 何勇, 田志宏. 植物叶绿体遗传转化技术及应用研究进展[J]. 长江大学学报(自科版), 2017, 14(14): 52–57.
- [29] DÍAZ A H, KOOP H U. *Nicotiana tabacum*: PEG-mediated plastid transformation[J]. Methods Mol Biol, 2014, 1132: 165.
- [30] NUGENT G D, TEN HAVE M, VAN DER GULIK A, et al. Plastid transformants of tomato selected using mutations affecting ribosome structure[J]. Plant Cell Rep, 2005, 24: 341–349.
- [31] NUGENT G D, COYNE S, NGUYEN T H, et al. Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var. Botrytis (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplasts[J]. Plant Sci, 2005, 170: 135–142.
- [32] LELIVELT C L, MCCABE M S, NEWELL C A, et al. Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.)[J]. Plant Mol Biol, 2005, 58: 763–774.
- [33] 刘博林, 岳绍先, 胡乃璧, 等. 龙葵 Atrazine 抗性基因向大豆叶绿体的转移及在转基因植株中的表达[J]. 中国科学(B 辑), 1989(7): 699–705.
- [34] WEBER G. Uptake of DNA in chloroplast *Brassica napus* facilitated by a UV–laser microbeam[J]. Eur J Cell Biol, 1989, 49: 73–79.
- [35] 孔倩倩, 李志辉, 王琼, 等. 纳米基因载体在植物遗传转化中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(6): 6–12.
- [36] 王安琪, 朱华新, 赵翔, 等. 基于纳米基因载体的动植物遗传转化研究进展[J]. 生物技术进展, 2018(4): 293–301.
- [37] RAFSANJANI M S O, ALVARI A, SAMIM M, et al. Application of novel nanotechnology strategies in plant biotransformation: A contemporary overview[J]. Recent Pat Biotechnol, 2012, 6(1): 69–79.
- [38] TORNEY F, TREWYN B G, LIN V S Y, et al. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants[J]. Nat Nanotechnol, 2007, 2(5): 295–300.
- [39] KWAK S Y, LEW T T S, SWEENEY C J, et al. Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers[J]. Nat Nanotechnol, 2019, 14(5): 447–455.
- [40] DANIELL H, DATTA R, VARMA S, et al. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16: 345–348.
- [41] KANG T J, SEO J E, LOC N H, et al. Herbicide resistance of tobacco chloroplasts expressing the bar gene[J]. Mol Cells, 2003, 16: 60–66.
- [42] MCBRIDE K, SVAB Z, SCHAAF D, et al. Amplification of a chimeric Bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco[J]. Biotechnol, 1995, 13: 362–365.
- [43] DEGRAY G, RAJASEKARAN K, SMITH F, et al. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi[J]. Plant Physiol, 2001, 127: 852–862.
- [44] KUMAR S, DHINGRA A, DANIELL H. Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance[J]. Plant Physiol, 2004, 136: 2843–2854.
- [45] KOTA M, DANIELL H, VARMA S, et al. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry-Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 1840–1845.
- [46] COSA B D, MOAR W, LEE S B, et al. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals[J]. Nat Biotechnol, 2001, 19: 71–74.
- [47] CHAKRABARTI S K, LUTZ K A, LERTWIRIYAWONG B, et al. Expression of *thecy9Aa2* B.t. gene in tobacco chloroplasts confers resistance to potato tuber moth[J]. Transgenic Res, 2006, 15(4): 481–488.
- [48] 刘青青. 油菜叶绿体转化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [49] 李琨. 几种新型细胞器植物生物反应器的研究[J]. 生物技术通报, 2008(3): 33–35.
- [50] LEE S B, KWON H B, KWON S J, et al. Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance[J]. Mol Breed, 2003, 11: 1–13.
- [51] LUTZ K A, KNAPP J E, MALIGA P. Expression of bar in the plastid genome confers herbicide resistance[J]. Plant Physiol, 2001, 125(4): 1585–1590.
- [52] DANIELL H, KHAN M S, ALLISON L. Milestones in chloroplast genetic engineering: An environmentally friendly friendly era in biotechnology[J]. Trends Plant Sci, 2002, 7: 84–91.