

고등식물의 엽록체 형질전환: 원핵생물과 진핵생물의 조우

정화지¹, 서영배², 정원중¹, 민성란¹, 유장렬^{1*}

¹한국생명공학연구원 식물유전체연구센터, ²서울대학교 천연물과학연구소

Chloroplast Genetic Transformation in Higher Plants: An Encounter Between Prokaryote and Eukaryote

Hwa Jee Chung¹, Youngbae Suh², Won Joong Jeong¹, Sung Ran Min¹, and Jang R. Liu^{1*}

¹Plant Genomics Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-333, Korea

²Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul Korea

ABSTRACT Chloroplasts are believed to be descended from certain cyanobacteria, which were taken up by phagocytosis into a host cell and lived there in a symbiotic relationship. In contrast to the current static concept on the chloroplast genome, its dynamism has been recently demonstrated: the chloroplast genome is active in intramolecular homologous recombination, producing subgenomic circles when it obtains homologous sequences via genetic transformation. Chloroplast transformation in higher plants provides many advantages over nuclear transformation that include higher expression levels of transgenes, polycistronic expression of transgenes, and maternal transmission of transgenes. Tobacco has been used as a model for chloroplast genetic transformation. However, it is recently possible to transform the chloroplasts of other major food and economic crops including rice, soybean, and cotton. Chloroplast-transformed crops will be able to replace bioreactors using microorganisms for production of value-added proteins in future.

서 론

엽록체는 일반적으로 식물에만 존재하는 세포내소기관이어서 다른 세포내소기관에 비해 상대적으로 많은 연구가 되어 있지 않은 분야라고 할 수 있다. 그러나 엽록체 형질전환 기법의 발달에 따라 핵형질전환 방식에서 기대할 수 없는 여러 이점들이 부각되면서 엽록체 형질전환은 식물생명공학 분야의 주요 이슈 중 하나가 되었다. 본 총설에서는 엽록체 형질전환에 대한 심도있는 이해를 돕기 위해 엽록체 계놈의 구조와 진화에 대해 정리하였으며, 엽록체 형질전환과 핵형질전환의 비교분석 및 엽록체 형질전환의 응용에 초점을 두었다.

엽록체 계놈의 구조와 진화

내생공생자가설

1883년 A. Schimper는 엽록체 (색소체)는 남세균 (cyanobacteria)가 숙주세포에 포획되어 세포내에 공생하는 방식으로 진화된 것으로 이해하였다. 이를 내생공생자 가설 (endosymbiont hypothesis)이라고 한다. 진화과정에서 남세균의 유전정보가 핵으로 대거 이동하였다고 보여지는데 실제로 엽록체와 남세균의 아미노산 서열을 상호 비교해 보면 이런 가설이 타당한 것으로 드러나고 있다.

고등식물의 엽록체의 형태적 진화

대부분의 고등식물의 엽록체는 많게는 엽육세포에서 보

*Corresponding author Tel 042-860-4430 Fax 042-860-4608
E-mail: jrliu@kribb.re.kr

여지듯 100여개에 달한다. 이에 반해 *Chlamydomonas*와 같은 녹조에서는 단일 거대 엽록체가 세포당 한 개가 들어 있다. 고등식물이 녹조와 다르게 세포내에 다수의 작은 엽록체를 가지고 있는 것은 녹조와는 달리 이동성이 제한된 고등식물이 빛의 강도에 따라 강광을 받았을 때 빛에 의한 엽록체의 파괴를 피하고, 약광을 받았을 때 빛 에너지를 효과적으로 받아들이기 위해 광원 쪽으로 옮겨야 할 상황에 신속하게 대응하기 위하여 몸집을 줄이고 숫자를 늘리는 방식으로 진화한 것으로 보인다 (Jeong et al. 2002).

엽록체 게놈의 구조

반세기 전 일본 학자들에 의하여 엽록체 내에 DNA가 존재할 것으로 제시된 이후 (Chiba, 1951), Shinozaki et al. (1986)에 의해서 담배에서 처음으로 전체 엽록체 게놈의 염기서열이 확인되었으며, 곧 이어 우산이끼 (Ohyama et al. 1986)와 벼의 전체 엽록체 게놈의 염기서열이 발표되었다 (Hiratsuka et al. 1989). 이에 따라 엽록체 게놈에 대한 새로운 인식과 더불어 DNA 염기서열 분석의 자동화 기술이 급속히 발전되면서, 최근까지 51 종에 대하여 전체 엽록체 게놈의 염기서열이 확인되었으며, 이중 25종은 최근 2-3년 사이에 보고된 것으로 보아, 엽록체 게놈의 비교분석에 관한 연구는 급속도로 증가하고 있는 실정이다 (Bausher et al. 2006, Daniell et al. 2006, Jansen et al. 2005, Kim et al. 2006, Ravi et al. 2006, Ruhlman et al. 2006, Steane 2005).

육상식물의 엽록체 게놈은 원형으로 되어있으며, 대체적으로 그 크기는 120-160 kb의 범위에 속한다. 원형의 엽록체 게놈은 크게 네 부분으로 구성되는데, 방향이 역전되어 염기서열이 완전히 동일한 두 개의 inverted repeat (IR) 구간이 존재하며, 이들로 인하여 나머지 부분이 large single copy (LSC) 구간과 small single copy (SSC) 구간으로 나뉘어 진다. 완전한 염기서열의 분석이 이루어진 담배의 경우를 보면 엽록체 게놈의 전체 크기는 155,939 bp이며, LSC는 86,686 bp, SSC는 18,571 bp, 그리고 IR는 각각 25,341 bp 인 것으로 최종 확인되었다 (Wakasugi et al. 1998). 담배 엽록체 게놈에서는 현재 113 개의 유전자가 확인되었으며, 대체적으로 육상식물의 엽록체 게놈은 110-130 개의 유전자를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이 중 약 80 개는 광합성 혹은 유전자 발현에 수반되는 단백질 coding 유전자이며, 나머지는 약 30 개의 transfer RNA, 그리고 4개의 ribosomal RNA (23S, 16S, 5S, 4.5S)를 coding 하는 유전자로 확인되었다 (Wakasugi et al. 2001).

엽록체 게놈의 진화

대체적으로 육상식물의 엽록체 게놈은 구조적으로 안정되

어 두개의 IR, LSC, SSC로 이루어진 구조가 잘 보존되어있고, 엽록체 게놈 내의 유전자의 내용과 구성이 넓은 범위의 육상식물을 통해서 상당히 유사한 것으로 알려져 왔으나, 실질적으로 유전자 및 intron의 유실, 일부 구간에서의 역전 현상, IR의 소실 및 크기의 변이 등이 종종 관찰되고 있다 (Odintsova and Yurina 2003). 담배의 엽록체 게놈의 81 개 단백질 coding 유전자와 우산이끼 엽록체 게놈의 86 개 단백질 유전자 중에서 78 개가 서로 동일하다는 사실에서 (Martin et al. 2002), 엽록체 게놈은 광합성기능과 독립적인 단백질합성을 수행할 수 있는 최소한의 필수적인 유전자들만 유지하고, 상당수의 나머지 유전자는 원핵생물체가 내재공생에 의하여 식물세포의 엽록체로 자리잡는 진화과정의 매우 초기 단계에서 핵으로 이전되거나 소실되었을 것으로 추정된다 (Martin et al. 1998, 2002). 유전자 소실은 생명현상을 유지하는데 반드시 필요하지 않거나, 미토콘드리아 게놈 등에 유사 유전자가 중첩되어 있을 경우에 일어나는 것으로 알려져 있다. 곰솔 (해송)의 엽록체 게놈에서는 11개의 *ndh* 유전자가 소실되거나 pseudogene의 형태로만 남아있는데, 이는 이들이 미토콘드리아 게놈에 *ndh* 유전자와 중복되어 존재하기 때문인 것으로 추정된다 (Wakasugi et al. 1994). 유전자 소실의 극단적인 예는 비광합성 기생식물의 일종인 *Epifagus*의 색소체 게놈에서 광합성에 관여하는 유전자의 대대적인 소실이 일어나 전체 게놈의 크기가 1/2 정도로 축소된 것으로 유전자 소실은 그 유전자 산물이 수반되는 기능의 존재와 매우 밀접한 연관이 있는 것을 알 수 있다. 즉 비광합성 기생식물의 경우 광합성 과정에 필요한 유전자들의 소실이 급격하게 일어난 것으로 추정된다 (dePamphilis and Palmer 1990, Wolfe et al. 1992).

엽록체 게놈의 일부 구간이 뒤집어져서 구조적 재조합이 일어나 유전자 순서나 염기서열이 나머지 구간과 비교해서 부분적으로 반대로 되기도 한다. 특히 non-coding 구간에서는 이와 같은 역전현상이 상대적으로 쉽게 일어나고, 크기 200 bp 이하의 역전은 비교적 자주 관찰되기도 한다. 역전으로 인한 엽록체 게놈의 구조적 변화는 국화과 식물의 연구에서 잘 알려져 있는데, Jansen and Palmer (1987)은 국화과 식물의 계통학적 연구에서 LSC 구역에서 22 kb에 달하는 크기의 역전이 국화과 분화 과정의 초기 단계에서 일어난 것을 발견하여, 국화과 식물의 계통을 확립하는 중요한 증거로 제시한 바 있다. 우산이끼와 담배의 엽록체 게놈의 비교분석에서 30 kb 구간에 위치하는 유전자들의 순서가 반대인 사실에 입각하여, 육상식물에서 이 구간의 유전자 순서를 비교분석한 결과, 석송류 (lycopsids)를 제외한 모든 관속식물에서는 우산이끼와 비교하여 30 kb의 역전이 나타남으로써 석송류가 관속식물에서 가장 먼저 분화된 분류군임을 확인한 바 있다 (Raubeson and Jansen 1992). 이외에도 고사리 (Raubeson and Stein 1995), 대두과식물 (Lavin et al. 1990), 벼과 (Doyle et al. 1992), 미나

리아재비과 (Hoot and Palmer 1994) 등에서도 일부 역전이 알려져 있으며, 특히 초롱꽃과 식물에서는 40 개 이상의 빈번한 역전현상이 관찰되기도 하였다 (Cosner et al. 1997).

엽록체 게놈의 가장 현저한 구조적 특징은 두 개의 IR 구간이 존재하는 것인데 각 하나의 크기는 우산이끼와 담배에서 각각 약 10 kb, 25 kb 정도이다. 그러나 쥐손이과 식물인 *Pelargonium*에서는 IR 구간이 현저하게 확대되어 75 kb에 달하기도 한다 (Palmer et al. 1987a). 이외에도 초롱꽃과 (Cosner et al. 1997)에서도 IR 구간이 늘어난 것으로 보고되었다. 한편으로는 대두과식물의 일부와 송백류에서 IR 구간의 소실이 각각 독립적으로 일어난 것으로 알려져 있다 (Lavin et al. 1990, Palmer et al. 1987b, Tsudzuki et al. 1992). 엽록체 게놈에서 IR가 소실된 경우나 비정상적으로 확대되어 있는 경우에는 대체적으로 유전자의 순서가 상당수 뒤섞여 있는 것으로 나타나서, IR은 전체 엽록체 게놈의 구조적 안정성에 기여하는 것으로 추정하고 있다 (Palmer et al. 1987b).

가지과 식물 엽록체 게놈의 비교분석

다년생 초본식물인 감자는 벼, 밀, 옥수수 다음으로 중요한 작물이다. 따라서 최근에는 전통적 교배와 함께 생물공학기술을 이용하여 곤충 및 바이러스 내성을 지닌 감자와 전분과 단백질 함량이 조절된 감자 등을 생산하기 위한 많은 연구가 진행 중이다. 생물공학기술을 활용하기 위해서는 다양한 유전자 정보가 요구되는 데 특히 엽록체 게놈 정보는 외래유전자를 상동재조합에 의해 엽록체 게놈으로 도입시키는데 사용하는 벡터의 측면 염기서열 (flanking sequence)에 필요한 유전자 정보이다. 지금까지 가지과 식물에서 엽록체 게놈 서열 정보가 알려져 있는 것은 담배 (*Nicotiana tabacum* (Z00044), *N. sylvestris* (AB237912), *N. tomentosiformis* (AB240139)), *Atropa belladonna* (AJ316582), 토마토 (*Solanum lycopersicum* (DQ347959)), 야생종감자 (*S. bulbocastanum* (DQ347958)) 뿐이며, 주식으로 주로 사용하는 감자 엽록체 게놈 서열정보는 알려져 있지 않았다 (Shinozaki et al. 1986, Schmitz-Linne-weber et al. 2002, Daniell et al. 2006, Yukawa et al. 2006). 지금까지는 감자 엽록체 형질전환을 위해 담배 엽록체 게놈 아래의 flanking sequence를 사용하여 (Sidorov et al. 1999), 감자 엽록체 게놈이 염기서열이 꼭 필요한 실정이었다. 이에 본 연구실에서 감자 (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) 엽록체 형질전환 연구의 일환으로 감자 엽록체 게놈 염기서열을 결정하였다.

감자 엽록체 게놈은 155,312 bp 길이로 되어 있으며 18,373 bp의 IR, 85,749 bp의 LSC, 25,595 bp의SSC 구조로 되어있다 (Chung et al. 2006). 엽록체 게놈은 79개의 단백질, 30개의 tRNA, 4개의 rRNA가 포함되어 있으며 엽록체게놈 내에 유전

자의 위치는 나머지 6 종류의 가지과 식물의 경우와 매우 유사하였다. 그러나 가지과 내에서도 IR, coding 유전자 및 intergenic 부위의 길이 변이가 있음을 관찰하였다. 감자의 IR 길이는 토마토 (*S. lycopersicum*)의 것과 비슷하며 담배 (*N. tabacum*)에 비해 오히려 253 bp가 길었다. IR 부위로의 유전자의 extension 결과 pseudo 유전자가 생기는 데 가지과의 경우도 예외가 아니었다. 가령 감자의 IRb 부위의 pseudo ycf1 유전자 길이는 1,122 bp로 *Atropa belladonna* (1438 bp) 다음으로 길었다. IRa의 pseudo rps19 유전자 경우는 *N. tabacum*과 *N. sylvestris*를 제외하고 모두 관찰되었다. coding 유전자의 비교 분석 결과 감자는 야생종 감자 (*S. bulbocastanum*)와 함께 토마토와 가장 유사하였다. intergenic 부위의 길이 변화는 대부분 direct repeat에 의한 insertion/deletion인데 *petN-psbM*, *trnG-trnR*, *ndhC-trnV*, *petA-psbJ*, *ycf4-cemA*, *petB-petD*, *petD-rpoA*, *rps18-rpl20*, *rpl32-trnL* 유전자 사이의 insertion/deletion은 감자 (*Solanum tuberosum*) 엽록체 게놈에서만 관찰한 특징이었다. Direct repeat 없이 생긴 insertion/deletion은 *ndhC-trnV*, *Rpl18-rpl20*, *ycf3-trnS* 의 intergenic region인데 가장 특이한 점은 *ndhC-trnV* intergenic region의 241 bp deletion이다. 비교한 6가지 가지과를 포함하여 애기장대, 시금치, 벼, 옥수수, 인삼 등의 육상식물의 엽록체 게놈에는 241 bp deletion이 일어나지 않았다. 따라서 241-bp deletion은 재배종 감자 (*S. tuberosum*)와 야생종 감자 (*S. bulbocastanum*)를 구별할 수 있는 중요한 분자표지인자 (molecular marker)로 이용할 수 있다.

식물계통분류연구의 도구로서의 엽록체

육상식물을 전체적으로 비교하여 볼 때, 엽록체 게놈이 많은 차이가 나는 듯하나, 실질적으로 엽록체 게놈은 다른 게놈과 비교하여 그 구조가 상당히 안정되어 있다. 또한 세포내에서 많은 수의 분자가 동일한 형태로 존재하고(세포당 약 1,000개까지), 상대적으로 크기가 작기 때문에, 비교적 적은 양의 식물 재료로부터 손쉽게 엽록체 DNA를 추출할 수 있을 뿐만 아니라, 엽록체 게놈의 비교분석에 이용될 수 있도록 개발된 probe들이 넓은 범위의 식물 종류에 적용이 가능하며, 여러 종의 엽록체 게놈을 손쉽게 비교분석할 수 있게 되었다. 1980년 초기 식물의 계통분류 연구에 유전자의 비교분석 방법이 도입된 이래로 초기에는 담배 엽록체 게놈에서 얻어진 probe와 제한효소를 이용하여 제한효소 지도의 인식위치 및 엽록체 게놈의 구조적 변화를 계통분류학적 형질로 이용하였다. 그 후 유전자의 염기서열을 비교분석함으로써 식물의 계통을 추정하게 되었으며, 이 중 RUBISCO 유전자인 *rbcL*이 식물의 계통분류연구에 가장 많이 사용되었으며 종자식물의 전반적인 계통분석을 위하여 499종 *rbcL*의 비교분석이 이루어진바 있다 (Chase et al. 1993). 그 후 *ndhF*, *matK*, *trnL-trnF*

Table 1. Comparison of nuclear and chloroplast genetic transformation in higher plants.

Organell	Commonly used transformation method	Insertion of transgene into genome	Multiple transgenes as an operon	Copy number of transgene in a transgenic plant cell	Protein expression level (%) of transgene	Transmission of transgene
Nucleus	<i>Agrobacterium</i> or particle bombardment	Random	Not working	<10	<0.1	Paternal
Chloroplast	Particle bombardment	Homologous recombination	Working	up to 10,000	up to 10	Maternal

spcaer 및 *trnL* intron 등의 기타 엽록체 게놈의 유전자와 구간들이 여러 가지의 계통분류학적 목적의 비교분석에 이용되어 왔으며, 전통적인 형태학적 형질을 보완하는 새로운 증거를 제시할 수 있는 매우 효과적인 계통분류학적 도구로서 사용되어 오고 있는 실정이다. 최근에 들어서는 더욱 많은 유전자, 심지어는 전체 엽록체 게놈의 염기서열을 비교 분석함으로써 가능하면 더욱 정확한 계통분류학적 관계를 설정하고자 하는 시도가 이루어지고 있다 (Graham and Olmstead 2000, Goremykin et al. 2003 a, b).

엽록체 게놈은 미토콘드리아 게놈처럼 역동적이다.

고등식물의 원형질체 융합에 의한 잡종식물의 생산에 관한 연구를 통하여 연구자들이 경험하게 된 것은 미토콘드리아의 게놈은 재조합을 매우 높은 빈도로 일으키는데 반하여 엽록체 게놈은 상대적으로 매우 낮은 빈도의 재조합이 일어난다는 것이었다. 또한 고등식물의 미토콘드리아의 게놈은 동물의 것과는 달리 크기가 매우 크고, intramolecular homologous recombination을 통하여 여러 개의 서로 다른 subgenomic circle로 나뉘어 질 수 있고, 또한 subgenomic circle 상호간의 homologous recombination에 의해 본래의 master circle로 변환이 가능하며 이런 과정에서 나타나는 DNA 재배열 (rearrangement)로 인해 서로 isomer의 형태를 한 master circle이 존재한다고 이해함으로써 subgenomic circle이 존재하지 않는 엽록체 게놈과 큰 차이를 보이는 것으로 보았다. 이에 따라 미토콘드리아 게놈은 동적 (dynamic)이고 엽록체 게놈은 정적 (static)이라는 이분법이 성립되었다.

그러나 우리 연구실에서 밝힌 바에 의하면 형질전환된 엽록체의 게놈은 homologous recombination에 필요한 repeat sequence를 얻게 됨으로써 미토콘드리아 게놈과 마찬가지로 subgenomic circle을 만드는 등 기본적으로 미토콘드리아의 게놈과 역동성에 있어서 차이가 없었다 (Liu et al. 2006). 이런 현상은 엽록체 형질전환 방식이 핵형질전환 방식보다 transgene의 환경으로의 방출의 관점에서 전적으로 안전하다고 보는 견해에 불리한 예가 된다. 현재로서는 고등식물의 형질전환용 cassette 벡터에 사용되는 프로모터 및 터미네이터

는 해당식물의 엽록체 유전자의 것이 아닌 원연의 것을 사용함으로써 형질전환된 엽록체 게놈이 자체적으로 또 한번의 homologous recombination을 일으켜 subgenomic circle을 만드는 것을 방지할 수 있다.

고등식물 엽록체의 형질전환

핵 형질전환과 엽록체 형질전환의 비교

1988년, 녹조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*의 *atpB* 돌연변이체의 엽록체로 야생형 유전자를 도입한 연구 (Boynton et al. 1988)를 기점으로 모델식물인 담배를 이용한 고등식물의 엽록체 형질전환 연구가 활발히 진행되어 왔다 (Svab et al. 1990, Svab and Maliga 1993). 식물세포는 약 100개 정도의 엽록체를 가지고 있으며 각 엽록체는 약 100 copy의 동일한 엽록체 게놈을 함유하므로 결국 식물 세포 당 엽록체 게놈은 10,000 copy에 이른다 (Maliga 2004). 따라서 엽록체 형질전환은 핵 형질전환과 비교하면 도입된 유전자의 발현 수준을 획기적으로 향상시킬 수 있는 장점이 있다. 일반적으로 핵형질전환에 의한 외래 유전자의 발현정도는 CaMV35S 프로모터를 사용하였을 때 총수용성단백질의 0.1% 수준이나 엽록체 형질전환의 경우 그 수준을 46.1%까지도 기대할 수 있다 (De Cosa et al. 2001). 또한 성숙한 식물의 화분 (pollen)에는 엽록체가 존재하지 않아 도입된 외래 유전자가 모계유전을 함으로써 형질전환된 식물을 포장에서 재배할 때 외래 유전자가 화분을 통하여 생태계의 야생종으로 수평 이동하여 발생할 수 있는 위해 가능성을 근원적으로 차단할 수 있는 이점이 있다. 핵 형질전환의 경우 여러 유전자를 도입하려는 gene stacking 시도가 있으나 이 경우는 여러 항생제 저항성 유전자들도 동시에 식물체내로 도입되어야 한다. 그러나 현재 식물 형질전환체 선발에 이용되는 항생제저항성 유전자는 2-3개 정도만 가능한 실정이다. 반면 엽록체 형질전환의 경우는 엽록체가 원핵세포 유래의 소기관이므로 다수의 외래 유전자를 원핵세포내의 오페론 (operon)형태로 동시에 도입하는 것이 가능하며, 핵 형질전환과는 달리 gene silencing, positional effect가 없어 외래유전자 발현이 용이하다 (Table 1).

Table 2. Chloroplast genetic transformation of higher plants

Year	Plant	Explant	Reference
1990	Tobacco (<i>Nicotiana tabcum</i>)	Leaf	Svab <i>et al.</i>
1998	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Leaf	Sikdar <i>et al.</i>
1999	Rice (<i>Oryza sativa</i>)	Embryogenic callus	Khan and Maliga
1999	Potato (<i>Solanum tuberosom</i>)	Leaf	Sidorove <i>et al.</i>
2001	Tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Leaf	Ruf <i>et al.</i>
2003	Rape (<i>Lesquerella fendleri</i>)	Leaf	Skarjinskaia <i>et al.</i>
	Rape (<i>Brassica napus</i>)	Cotyledon, petiole	Hou <i>et al.</i>
2004	Carrot (<i>Daucus carota</i>)	Embryogenic callus	Kumar <i>et al.</i>
	Soybean (<i>Glycine max</i>)	Embryogenic callus	Dufourmantel <i>et al.</i>
	Cotton (<i>Gossypoim hirsutum</i>)	Grayish-green friable callus	Kumar <i>et al.</i>
	Petunia (<i>Petunia hybrida</i>)	Leaf	Zubkot <i>et al.</i>
2005	Lettuce (<i>Lactuca sativa</i>)	Leaf protoplast	Lelivelt <i>et al.</i>

엽록체 형질전환에 의해 생성된 외래 단백질은 엽록체내에 축적되므로 핵형질전환에 의해 세포질에 형성되어 세포에 해를 줄 수 있는 종류의 단백질 생산에 유리하다. 예컨대, trehalose synthase 유전자를 핵 형질전환 방식으로 도입하면 trehalose가 세포질에서 독성을 나타내지만 엽록체 형질전환을 하였을 때는 엽록체내에서 독성을 나타내지 않는다 (Lee *et al.* 2003).

담배의 엽록체 형질전환에 이어 다른 고등식물의 엽록체 형질전환 연구가 활발히 진행되어 왔으나 벼를 비롯하여 작물에 적용한 경우는 불과 수 년 전이다 (Khan and Maliga 1999). 벼의 경우는 heteroplasmic한 형질전환체가 얻어졌으나 쌍자엽 작물인 감자 (Sidorove *et al.* 1999), 토마토 (Ruf *et al.* 2001), 유채 (Hou *et al.* 2003, Skarjinskaia *et al.* 2003), 당근 (Kumar *et al.* 2004), 대두 (Dufourmantel *et al.* 2004)의 엽록체 형질전환이 성공하였다 (Table 2). 특히 당근과 대두의 경우 기관형성 (organogenesis) 방식이 아닌 체세포배발생 (somatic embryogenesis) 방식을 사용하여 성공하였다. 따라서 조직배양에 의해 식물체재생이 가능한 모든 식물의 엽록체 형질전환이 가능할 것으로 전망된다. 핵형질전환시에는 “universal vector”를 사용할 수 있지만 homologous recombination 방식을 쓰는 엽록체 형질전환시에는 엽록체 게놈의 염기서열이 식물에 따라 다르므로 식물의 종에 따라 특이적인 벡터를 사용하여야 한다. 가지과에 속한 식물이라 할 지라도 담배 벡터를 담배이외의 식물에 사용하면 해당식물의 엽록체 게놈의 target site의 염기서열의 차이에 의해 형질전환 빈도가 크게 감소한다 (Grevich and Daniell 2005).

엽록체 형질전환 방법

유전적으로 안정된 엽록체 형질전환 식물체를 얻기 위해

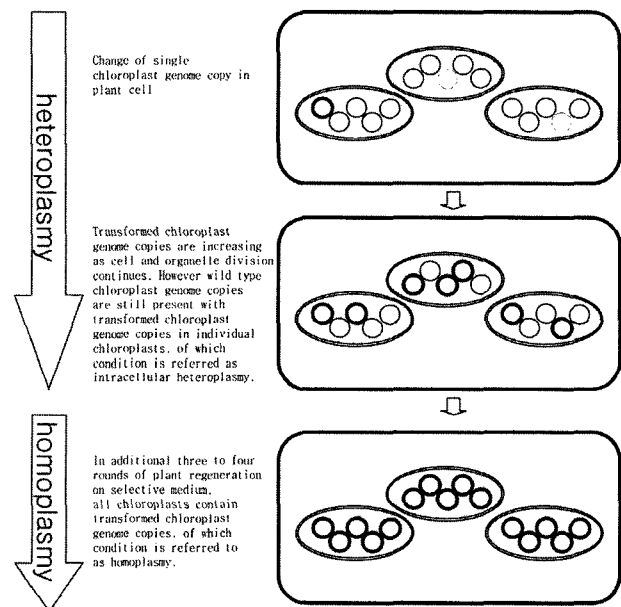


Figure 1. Transition of wild-type chloroplasts to transformed chloroplast.

서 세포 내에 존재하는 전체 엽록체 게놈 copy가 모두 도입된 유전자로 형질전환이 된 상태 즉 homoplasmy가 되어야 한다. 엽록체 형질전환의 초기단계는 수 만 copy의 엽록체 게놈 중 한 개 혹은 수 개의 게놈 copy만 외래 유전자를 갖게 된다. 그러나 항생제 선발 배지에서 서너 차례의 계대배양 및 재분화 단계를 거치는 동안 세포분열과 동시에 엽록체의 분열이 진행되면서 형질전환이 된 엽록체 게놈만 선별되어 최종적으로 모든 엽록체 내의 게놈 copy가 형질전환이 된 식물체를 얻을 수 있다 (Fig. 1).

엽록체 형질전환은 금 또는 텅스텐 입자로 코팅시킨 DNA를 유전자 총을 이용하여 직접 식물체내로 도입시키는 방법 (biolistic = biological + ballistic)이 많이 사용되고 있다.

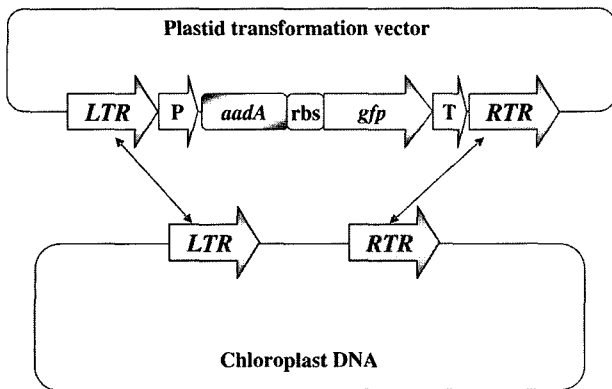


Figure 2. Chloroplast transformation vector. Vector consists of two flanking regions (LTR and RTR) of which sequences are same as those of integration targets in the chloroplast genome and two marker genes, *aadA* and *gfp*, that are dicistronically linked. P: promoter; rbs:ribosomal binding site; T: terminator.

Biolistics에 의한 엽록체 형질전환은 형질전환 방법이 비교적 간단하나 비용이 많이 드는 단점이 있다.

엽록체 형질전환 벡터 시스템

엽록체 형질전환은 핵 형질전환과는 달리 상동 재조합에 의해 외래 유전자가 위치 특이적으로 엽록체 게놈에 삽입되므로 엽록체 형질전환 벡터는 효율적인 상동 재조합을 위해 외래 유전자의 양측에 엽록체 게놈 DNA 서열과 동일한 DNA 단편을 포함하도록 제조한다 (Fig. 2). 초기에 사용한 엽록체 형질전환 벡터의 항생제 저항성 마커 유전자는 point mutation이 있는 16S rRNA (*rrn16*)를 사용하여 spectinomycin 혹은 streptomycin에서 저항성을 지닌 식물체를 선발하였다 (Svab et al. 1990). 그러나 *rrn16*의 point mutation은 열성이며 선발 빈도가 매우 낮은 단점을 지녔다. 반면 *aadA* (aminoglycoside 3'-adenyltransferase) 유전자에 의한 spectinomycin 저항성은 현재 사용하는 엽록체 형질전환 선발 마커 중 가장 효율적인 선발 시스템으로 알려져 있다 (Svab and Maliga 1993). 엽록체 형질전환 벡터에 사용하는 두번째 선발 유전자는 kanamycin 저항성 유전자인 *npIII* (neomycin phosphotransferase) 유전자이다 (Carrer et al. 1993). 또한 항생제 저항성 선발 유전자 대신 독성물질 betaine aldehyde를 비독성 물질인 glycine betaine으로 전환시키는 효소 BADH (betaine aldehyde dehydrogenase) 유전자를 사용한 예가 있다 (Daniell et al. 2001). 최근에는 green fluorescent protein 유전자를 항생제 저항 선발 유전자와 함께 사용하여 보다 효율적인 선발 시스템을 갖추게 되었다 (Jeong et al. 2004) (Fig. 2).

엽록체 형질전환 벡터 시스템의 또 다른 필수적인 요건은 프로모터와 번역 조절 염기서열 (leader)를 포함한 5'조절 부

위와 터미네이터가 포함된 3'조절부위이다 (Maliga 2002; 2003; 2004). 번역 조절 염기서열은 mRNA의 5'-UTR (untranslated region) 또는 5'-UTR과 코딩부위의 아미노산 말단 절편을 모두 포함한 5'-TCR (translation control region)이 될 수 있다. mRNA의 5'UTR은 mRNA 안정에 필요한 stem-loop 구조와 리보솜으로의 mRNA 이동을 용이하게 하는 염기서열을 포함하고 있다. 3' 조절부위의 터미네이터 역시 stem-loop 구조를 가지고 있으며, 엽록체 유전자 *psbA*, *rbcL*, *rps16*의 3' UTR를 흔히 사용한다. 프로모터로는 rRNA 오픈로 프로모터를 변형시킨 Prm 프로모터를 가장 많이 사용하는데 Prm은 엽록체에서 만들어진 RNA polymerase에 의해 인식되는 프로모터이다.

또한 앞서 밝힌 바와 같이 엽록체 벡터를 제작하려면 해당 식물의 엽록체 게놈의 target site의 염기서열을 밝혀서 해당 식물용 벡터를 만들어야 하며, 의도하는 homologous recombination 이외의 영역에서 해당식물의 엽록체 게놈과 벡터 사이에 상동성을 갖지 않도록 할 필요가 있다.

엽록체 형질전환의 응용

엽록체 형질전환의 농업적 이용

오늘날 엽록체 형질전환 방법은 색소체 발달과정, 광합성 관련연구 및 농업적 혹은 치료 목적의 유용 재조합단백질의 생산을 위한 목적으로도 다양하게 이용되고 있다. 식물체를 이용한 인체 치료용 단백질 생산은 여러 장점이 있다. 첫째, 식물시스템은 동물 또는 박테리아를 이용하는 생산 시스템보다 비용이 낮다. 둘째로 인체 병원균으로부터의 오염 가능성이 적다. 또한 식물체 내에서 발현된 경구용 백신의 경우는 재조합 단백질의 분리 과정이 필요 없다는 장점도 있다.

앞에서 언급하였듯이 엽록체 형질전환의 장점 중 하나는 세포당 엽록체 copy가 많아 높은 외래 단백질 발현이 가능하다는 것이다. 일례로 *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa2 단백질을 담배 엽록체 내에서 전체 수용성 단백질의 46.1%수준으로 발현시킨 연구 보고가 있다 (De Cosa et al. 2001). 또한 엽록체의 stroma에는 단백질분해 과정에 필요한 효소의 수가 제한적이어서 일부 외래단백질의 발현이 높을 뿐만 아니라 보다 안정적이라고 추측한다. 그러나 엄청난 양으로 만들어진 외래 단백질이 엽록체 내에서 어떤 수준만큼 안정화되는 지에 대해 여전히 연구해야 할 의문점이 있다.

엽록체 형질전환의 최초의 농업적 적용은 1995년 담배 엽록체에 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 독소 유전자 *CryIac*를 도입하여 총 수용성 단백질의 3-5% 수준까지 발현시킨 연구이다

(McBride et al. 1995). 그 후 Cry2Aa2 유전자 (Kota et al. 1999) 또는 Cry2Aa2 유전자와 함께 5' 상위부위에 있는 2개의 open reading frame을 포함한 Cry2Aa2 오페론 (De Cosa et al. 2001)을 담배 엽록체 계놈으로 도입하였다. 특히 Cry2Aa2 오페론을 도입한 형질전환체 경우는 발현된 단백질 양이 총 수용성 단백질의 46.1%에 해당하였으며 엽록체 내에서 단백질 결정체를 형성하였다. 따라서 결정체 외래단백질은 원심분리에 의해 간단하게 분리가 가능하다. Bt 독소 단백질이 발현된 담배 형질전환체 식물은 담배유충 (*Heliothis virescens*), 목화유충 (*Helicoverpa zea*), 비트유충 (*Spodoptera exigua*)에게 테스트를 한 결과 불과 2-4일 만에 매우 강한 독성 효과를 나타내었다.

유충에 저항성을 지닌 형질전환 식물 이외에도 곰팡이와 박테리아성 병원균에 저항성을 지닌 항균 펩타이드 MSI-99를 담배 엽록체에서 발현시켜 병원균 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*와 3종류의 곰팡이 *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Verticillium dahliae*에 대해 약 88-96% 저해 효과를 지닌 형질전환체를 생산하였다 (DeGray et al. 2001). 이외에도 Glyphosate 제초제 저항성 (Daniell et al. 1998, Iamtham and Day 2000), 내건성 (Lee et al. 2003), 내염성 (Kumar et al. 2004) 유전자들이 담배 엽록체 계놈으로 도입되었다. 그러나 내염성 유전자가 도입된 당근의 경우를 제외하고 대부분은 담배에 국한되어 있다.

최근 Bt Cry1Ab 독소유전자를 대두의 엽록체 계놈으로 도입하여 뿌리를 제외한 잎, 줄기, 종자에서 높은 수준으로 발현된 개체를 생산하였다 (Dufourmantel et al. 2005). 비록 형질전환 효율은 높지 않지만 도입된 유전자는 다음 세대에서도 유지되었으며 벨벳빈 애벌레인 *Anticarsia gemmatilis*에 강한 살충 효과를 보였다. 이런 결과는 엽록체 형질전환 기술을 농작물에 실질적인 적용 가능성을 보여주었으며 향후 엽록체 형질전환 효율을 높일 수 있는 연구와 함께 감자, 옥수수, 벼와 같은 경제성 작물로 확대할 필요성이 있다.

엽록체 형질전환의 의학적 이용

담배식물체를 바이오리액터로 이용한다면 대장균 (*E. coli*) 대량배양 시스템에 비해 외래 단백질 생산비용이 50분의 1 정도에 지나지 않는 것으로 계산되었다 (Kusnadi, et al. 1997). 지금까지 엽록체 형질전환을 이용하여 시도된 인체 유용 치료 단백질 및 백신의 경우, 전반적으로 단백질 발현 수준이 7-8% 이내로 핵에 유전자를 도입한 경우보다 매우 높다. 한편, 파상풍 백신을 비롯하여 항균펩타이드, 인터페론 알파, 탄저균, 개의 parvovirus (CPV) VP2 항원의 발현은 총 수용성 단백질 양의 10-31.1% 수준까지 발현이 가능하였다 (Grevich

and Daniell 2005). TetC는 파상풍 백신으로 사용 가능한 비독성의 47 kDa 크기의 폴리펩타이드 절편으로, TetC를 전사하는 유전자를 담배의 엽록체에서 발현시킨 결과 최대 31.1% 수준의 TetC 단백질을 생산하였으며 형질전환 식물체의 추출물을 쥐에게 처리하여 면역력을 지닌 실험쥐를 획득하는 데 성공하였다 (Tregoning et al. 2003).

엽록체 형질전환의 문제점 및 앞으로의 전망

엽록체, amyloplast, chromoplast를 포함한 색소체를 이용한 식물유전공학은 높은 단백질 발현, 모계유전에 의한 생태계의 바이오안정성, 여러 유전자들의 도입, gene silencing과 position effect가 생기지 않는 등의 특징으로 전통적인 육종 재배와 비교해서 많은 장점이 있으나 보다 실용적인 측면의 응용을 위해서 여전히 해결해야 할 몇 가지 문제점이 있다. 엽록체 형질전환은 주로 담배를 이용하였으며 애기장대는 1998년에 가능하게 되었고 (Sikdar et al. 1998), 1999년 처음으로 작물인 벼에 시도하였다 (Khan and Maliga 1999). 그러나 형질전환체가 대부분 heteroplasmic이며 도입된 유전자가 다음 세대로 전달되지 않았다. 이어서 감자 (Sidorove et al. 1999), 토마토 (Ruf et al. 2001), 유채 (Hou et al. 2003, Skarjnskaia et al. 2003), 당근 (Kumar et al. 2004), 대두 (Dufourmantel et al. 2004) 등의 작물의 엽록체 형질전환도 시도되었으나 형질전환 효율이 담배에 비해 매우 낮았다. 애기장대 경우는 40회 내지 151회의 bombardment를 시도하여 한 개의 불임성인 엽록체 형질전환체를, 감자와 토마토의 경우는 각각 25회와 10회의 bombardment를 시도하여 1개체씩 형질전환체를 얻는 정도이다. 엽록체 형질전환은 앞서서 언급한 바처럼 항생제 선발 배지에서 서너 차례의 계대배양 및 재분화 단계를 거치는 동안 세포분열과 동시에 엽록체의 분열이 진행되면서 형질전환 된 엽록체 계놈만 선별되어 최종적으로 모든 엽록체 내의 계놈 copy가 형질전환이 된 식물체를 선별하는 과정이다. 따라서 작물에서의 엽록체 형질전환 효율을 높이기 위해서는 재분화가 잘 되는 조직배양 시스템이 먼저 개발되어야 한다. 또한 잎의 엽록체에서 특정물질을 과발현 시킬 경우 광합성에 저해를 가져오거나 경구용 백신 및 항체 등의 외래단백질을 조직 특이적 (과일, 종자, 뿌리 등)으로 발현시키고자 할 때 사용할 수 있도록 잎 (chloroplast) 대신 꽃과 과일 (chromoplast), 뿌리와 배유 (amyloplast) 등에 존재하는 색소체에서도 발현이 가능한 벡터카세트 개발의 필요성이 있다.

엽록체 형질전환 시 동시에 도입되는 선발마커 역시 대부분 미생물유래의 항생제 저항성 유전자를 사용한다. 엽록체

유전자들이 모계유전을 함에도 불구하고 선발마커 유전자들이 야생형 또는 미생물로 이동할 가능성을 배제할 수는 없다. 따라서 엽록체 형질전환에서도 marker-free 시스템이 요구된다. 최근 CRE/lox system과 pigmentation mutant phenotype의 restoring system을 이용하여 선발 마커 만들 효율적으로 제거하는 방법이 연구되고 있다 (Klaus et al. 2004, Maliga 2003). 아울러 최근에는 대두, 당근, 목화외의 경우 embryogenic callus를 사용하여 엽록체 형질전환을 시도하여 비교적 높은 형질전환 효율을 얻은 연구 결과가 있어 (Dhingra and Daniell 2006) 엽록체 형질전환 기술의 작물로의 적용이 매우 고무적이라고 하겠다.

적 요

엽록체는 숙주세포에 잡아먹힌 (식균작용) 남세균이 숙주세포와 공생관계를 형성하여 온 것으로 간주된다. 엽록체 게놈은 정적이라고 이해하고 있지만 형질전환을 통하여 상동염기가 도입되면 이와는 반대로 intramolecular homologous recombination에 의해 subgenomic circle을 만드는 등 매우 다이나믹하다는 것이 최근에 증명되고 있다. 고등식물의 엽록체 형질전환은 핵 형질전환에서 기대할 수 없는 여러 이점을 제공한다. 예컨대, transgene의 발현율을 높일 수 있고, transgene들을 polycistronic하게 발현할 수 있으며, 도입된 transgene이 모계유전을 하게 된다는 것 등이다. 담배는 엽록체 형질전환의 모델 식물로 사용되어 왔으나 최근에는 벼, 대두, 면화 등 다른 주요 작물의 형질전환도 가능하게 되었다. 엽록체 형질전환된 작물은 미생물을 이용하여 고부가가치 단백질을 생산하는 생물반응기를 향후 대체할 수 있게 될 것이다.

사 사

본 논문은 과학기술부의 21세기 프론티어 프로그램 작물 유전체연구단, 극한생물사업단, 바이오그린 21사업단, 과학재단 우수연구센터 (경희대 식물대사연구센터), 한국생명공학연구원 기본사업의 분자표적핵심기반기술개발사업의 연구비 지원으로 이루어졌음.

인용문헌

Bausher MG, Singh ND, Lee SB, Jansen RK, Daniell H (2006) The complete chloroplast genome sequence of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var 'Ridge Pineapple': orga-

- nization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *BMC Plant Biol* 6: 21
- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, Sanford JC (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538
- Carrer H, Hockenberry TN, Svab Z, Maliga P (1993) Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Mol Gen Genet* 241: 49-56.
- Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, Morgan D, Les DH, Mishler BD, Duvall MR, Price RA, Hills HG, Qiu Y-L, Kron KA, Rettig JH, Conti E, Palmer JD, Manhart JR, Sytsma KJ, Michaels HJ, Kress WJ, Karol KG, Clark WD, Hedren M, Gaut BS, Jansen RK, Kim K-J, Wimpee CF, Smith JF, Furnier GR, Strauss SH, Xiang Q-Y, Plunkett GM, Soltis PS, Swensen SM, Williams SE, Gadek PA, Quinn CJ, Eguiarte LE, Golenberg E, Learn, Jr. GH, Graham SW, Barrett SCH, Dayanandan S and Albert VA (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of Missouri Botanical Garden* 80: 528-580
- Chiba Y (1951) Cytochemical studies on chloroplasts. I. Cytologic demonstration of nucleic acids in chloroplasts. *Cytologia (Tokyo)* 16: 259-264
- Chung HJ, Jung JD, Park HW, Kim JH, Cha HW, Min SR, Jeong WJ, Liu JR (2006) The complete chloroplast genome sequences of *Solanum tuberosum* and comparative analysis with Solanaceae species identified the presence of a 241-bp deletion in cultivated potato-chloroplast DNA sequence. *Plant Cell Rep* (in press)
- Cosner ME, Jansen RK, Palmer JD, Downie SR (1997) The highly rearranged chloroplast genome of *Trachelium caeruleum* (Campanulaceae): multiple inversions, inverted repeat expansion and contraction, transposition, insertions/deletions and several repeat families. *Curr Genet* 31: 419-429
- Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S, Lee SB (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat Biotechnol* 16: 345-348
- Daniell H, Muthukumar B, Lee SB (2001) Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet* 39: 109-116
- Daniell H, Lee SB, Grevich J, Saski C, Quesada-Vargas T, Guda C, Tomkins J, Jansen RK (2006) Complete chloroplast genome sequences of *Solanum bulbocastanum*, *Solanum lycopersicum* and comparative analyses with other Solanaceae genomes. *Theor Appl Genet* 112: 1503-1518
- De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H (2001) Overexpression of the Bt *cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nat Biotechnol* 19: 71-74
- DeGray G, Rajasekaran K, Smith F, Sanford J, Daniell H (2001) Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol* 127: 852-862
- dePamphilis CW, Palmer JD (1990) Loss of photosynthetic

- 2001) Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi. *Plant Physiol* 127: 852-862
- dePamphilis CW, Palmer JD (1990) Loss of photosynthetic and chlororespiratory genes from the plastid genome of a parasitic flowering plant. *Nature* 348: 337-339
- Dhingra A, Daniell H (2006) Chloroplast genetic engineering via organogenesis or somatic embryogenesis. *Methods Mol Biol* 323: 245-262
- Doyle JJ, Davis JI, Soreng RJ, Garvin D, Anderson MJ (1992) Chloroplast DNA inversion and the origin of the grass family (Poaceae). *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7723-7726
- Dufourmantel N, Tissot G, Goutorbe F, Garcon F, Muhr C, Jansens S, Pelissier B, Peltier G, Dubald M (2005) Generation and analysis of soybean plastid transformants expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protoxin. *Plant Mol Biol* 58: 659-668
- Goremykin VV, Hirsch-Ernst KI, Wolf S, Hellwig FH (2003a) Analysis of the *Amborella trichopoda* chloroplast genome sequence suggests that *Amborella* is not a basal angiosperm. *Mol Biol Evol* 20: 1499-1405
- Goremykin VV, Hirsch-Ernst KI, Wolf S, Hellwig FH (2003b) The chloroplast genome of the 'basal' angiosperm *Calycanthus fertillis* - structural and phylogenetic analyses. *Plant Sys Evol* 242: 119-135
- Grevich JJ, Daniell H (2005) Chloroplast genetic engineering: recent advances and future perspectives. *Crit Rev Plant Sci* 24: 83-107
- Graham SW, Olmsgtead RW (2000) Utility of 17 chloroplast genes for inferring the phylogeny of the basal angiosperms. *Amer J Bot* 87: 1712-1730
- Hiratsuka J, Shimada H, Whittier R, Ishibashi T, Sakamoto M, Mori M, Kondo C, Honji Y, Sun CR, Meng BY, Li YQ, Kanno A, Nishizawa Y, Hirai A, Shinozaki K, Sugiura M (1989) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet* 217: 185-194
- Hoot SB, Palmer JD (1994) Structural rearrangements, including parallel inversions, within the chloroplast genome of *Anemone* and related genera. *J Mol Evol* 38: 274-281
- Iamtham S, Day A (2000) Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nat Biotechnol* 18: 1172-1176
- Jansen RK, Palmer JD (1987) A chloroplast inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5818-5822
- Jansen RK, Raubeson LA, Boore JL, dePamphilis CW, Chumley TW, Haberle RC, Wyman SK, Alverson AJ, Peery R, Herman SJ, Fourcade HM, Kuehl JV, McNeal JR, Leebens-Mack J, Cui L (2005) Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. *Methods Enzymol* 395: 348-384
- Jeong SW, Jeong WJ, Woo JW, Choi DW, Park YI, Liu JR (2004) Dicistronic expression of the green fluorescent protein and antibiotic resistance genes in the plastid for selection and tracking of plastid-transformed cells in tobacco. *Plant Cell Rep* 22: 747-751
- Jeong WJ, Park YI, Suh KH, Raven JA, Yoo WJ, Liu JR (2002) A large population of small chloroplasts confer more effective chloroplast movement over a few enlarged chloroplasts in tobacco leaf cells. *Plant Physiol* 129: 112-121
- Khan MS, Maliga P (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol* 17: 910-915
- Kim JS, Jung JD, Lee JA, Park HW, Oh KH, Jeong WJ, Choi DW, Liu JR, Cho KY (2006) Complete sequence and organization of the cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Baekmibaekdadagi) chloroplast genome. *Plant Cell Rep* 25: 334-340
- Klaus SM, Huang FC, Golds TJ, Koop HU (2004) Generation of marker-free plastid transformants using a transiently cointegrated selection gene. *Nat Biotechnol* 22: 225-229
- Kota M, Daniell H, Varma S, Garczynski SF, Gould F, Moar WJ (1999) 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* 96: 1840-1845
- Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004) Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol* 136: 2843-2854
- Kusnadi A, Nikolov G, Howard, J (1997) Production of recombinant proteins in plants: practical considerations. *Biotechnol Bioengineer* 56: 473-484
- Lavin M, Doyle JJ, Palmer JD (1990) Systematic and evolutionary significance of the loss of the large chloroplast DNA inverted repeat in the family Leguminosae. *Evolution* 44: 390-402
- Lee SB, Kwon HB, Kwon SJ, Park SC, Jeong MJ, Han SE, Byun MO, Daniell H (2003) Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Mol Breed* 11: 1-13
- Liu JR, Jeong WJ, Chung HJ, Min SR, Park JY (2006) Plastid transformation system to prevent the intramolecular recombination of transgene. *PCT/2006/004377*
- Maliga P (2002) Engineering the plastid genome of higher plants. *Curr Opin Plant Biol* 5: 164-172
- Maliga P (2003) Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotechnol* 21: 20-28
- Maliga P (2004) Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 55: 289-313
- Martin M, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D (2002)

- Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12246-12251
- Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hansmann S, Hasegawa M, Kowallik KV (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393: 162-165
- McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ, Hogan PS, Stalker DM, Maliga P (1995) Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Biotechnology (NY)* 13: 362-365
- Odintsova MS, Yurina NP (2003) Plastid genome of higher plants and algae: structure and functions. *Mol Biol* 37: 649-662
- Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano T, Sano S, Umesono K, Shiki Y, Takeuchi M, Chang Z, Aota S, Inokuchi H, Ozeki H (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574
- Palmer JD, Aldrich J, Thompson WF (1987b) Chloroplast evolution among legumes: loss of a large inverted repeat occurred prior to other sequence rearrangements. *Curr Genet* 11: 275-286
- Palmer JD, Nugent JM, Herbon LA (1987a) Unusual structure of geranium chloroplast DNA: a triple-sized inverted repeat, extensive gene duplications, multiple inversions and two repeat families. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 769-773
- Raubeson LA, Jansen RK (1992) Chloroplast DNA evidence on the ancient evolutionary split in vascular land plants. *Science* 255: 1697-1699
- Raubeson LA and Stein DB (1995) Insights into fern evolution from mapping chloroplast genomes. *American Fern Journal* 85: 193-204
- Ravi V, Khurana JP, Tyagi AK, Khurana P (2006) The chloroplast genome of mulberry: complete nucleotide sequence, gene organization and comparative analysis. *Tree Genetics and Genomes* (in press)
- Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H, Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *nature Biotech* 19: 870-875
- Ruhlman T, Lee SB, Jansen RK, Hostetler JB, Tallon LJ, Town CD, Daniell H (2006) Complete plastid genome sequence of *Daucus carota*: implications for biotechnology and phylogeny of angiosperms. *BMC Genomics* 7: 222
- Schmitz-Linneweber C, Regel R, Du TG, Hupfer H, Herrmann RG, Maier RM (2002) The plastid chromosome of *Atropa belladonna* and its comparison with that of *Nicotiana tabacum*: the role of RNA editing in generating divergence in the process of plant speciation. *Mol Biol Evol* 19: 1602-1612
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chungwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* 5: 2043-2049
- Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PT, Staub JM, Nehra NS (1999) Technical Advance: Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J* 19: 209-216
- Sikdar SR, Serino G, Chaudhuri S, Maligap (1998) Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* *Plant Cell Rep* 18: 20-24
- Steane DA (2005) Complete Nucleotide Sequence of the Chloroplast Genome from the Tasmanian Blue Gum, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *DNA Res* 2005 12: 215-220
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8526-8530
- Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 913-917
- Tregoning JS, Nixon P, Kuroda H, Svab Z, Clare S, Bowe F, Fairweather N, Ytterberg AJ, van Wijk KJ, Dougan G, Maliga P (2003) Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res* 31: 1174-1179
- Tsudzuki J, Nakashima K, Tsudzuki T, Hiratsuka J, Shibata M, Wakasugi T, Sugiura M (1992) Chloroplast DNA of black pine retains a residual inverted repeat lacking rRNA genes: nucleotide sequences of *trnQ*, *trnK*, *psbA*, *trnI* and *trnH* and the absence of *rps16*. *Mol Gen Genet* 232: 206-214
- Wakasugi T, Sugita M, Tsudzuki T, Sugiura M (1998) Updated gene map of tobacco chloroplast DNA. *Plant Mol Biol Rep* 16: 231-241
- Wakasugi T, Tsudzuki J, Ito S, Nakashima K, Tsudzuki T, Sugiura M (1994) Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black Pine *Pinus thunbergii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9794-9798
- Wakasugi T, Tsudzuki T, Sugiura M (2001) The genomics of land chloroplasts: gene content and alteration of genomic information by RNA editing. *Photosyn Res* 70: 107-118
- Wolfe KH, Morden CW, Palmer JD (1992) Function and evolution of minimal plastid genome from a nonphotosynthetic parasitic plant. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10648-10652
- Yukawa M, Tsudzuki T, Sugiura M (2006) The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirms that the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum*. *Mol Genet Genomics* 275: 367-373