

안정적 감자 엽록체 형질전환 식물체 생산

민성란 · 정원중 · 박지현 · 유재일 · 이정희 · 오광훈 · 정확지 · 유장렬

Production of stable chloroplast-transformed plants in potato (*Solanum tuberosum* L.)

Sung Ran Min · Won Joong Jeong · Ji Hyun Park · Jae Il Lyu · Jeong Hee Lee · Kwang Hoon Oh · Hwa-Jee Chung · Jang R. Liu

Received: 4 March 2011 / Accepted: 15 March 2011
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Chloroplast genetic engineering of higher plants offers several unique advantages compared with nuclear genome transformation, such as high levels of transgene expression, a lack of position effect due to site-specific transgene integration by homologous recombination, multigene engineering in a single transformation event and reducing risks of gene flow via pollen due to maternal inheritance. We established a reproducible chloroplast transformation system of potato using a tobacco specific plastid transformation vector, pCtVG (*trnI-Prn-aadA-mgfp-TpsbA-trnA*). Stable transgene integration into chloroplast genomes and the homoplasmic state of the transgenome were confirmed by PCR and Southern blot analyses. Northern, immunoblot analysis, and GFP fluorescence imaging revealed high expression and accumulation of GFP in the plastids of potato leaves. This system would provide new opportunities for genetic improvement and mass production of value added foreign proteins in this crop.

서론

담배를 이용한 고등식물의 엽록체 형질전환 시스템이 확

립 (Svab et al. 1990)된 이후 주로 쌍자엽 작물인 감자 (Sidorov et al. 1999), 토마토 (Ruf et al. 2001), 콩 (Dufourmantel et al. 2004), 상추 (Lelivelt et al. 2005), 당근 (Kumar et al. 2004a), cauliflower (Nugent et al. 2006), 양배추 (Liu et al. 2007), 가지 (Singh et al. 2010), sugar beet (De Marchis et al. 2009)와 같은 edible 작물, 목화 (Kumar et al. 2004b), 유채 (Hou et al. 2003)와 같은 산업용 작물, 배추과에 속하는 *Arabidopsis* (Sikdar et al. 1998), *Lesquerella fendleri* (Skarjinskaia et al. 2003) 및 페튜니아 (Zubko et al. 2004), 포플러 (Okumura et al. 2006) 등 다양한 작물에서 엽록체 형질전환 시스템이 확립되었고 재조합 단백질 생산을 위한 바이오리액터로서 엽록체 형질전환이 이용되고 있다 (Wang et al. 2009). 단자엽 작물의 경우, 아직 효율적인 엽록체 형질전환 시스템이 확립되어 있지 않으며 벼에서 heteroplasmic한 엽록체 형질전환 식물체를 얻은 바 있다 (Lee et al. 2006). 아직까지도 담배를 제외한 다른 작물에서는 낮은 엽록체 형질전환 효율 (Sidorov et al. 1999; Zubko et al. 2004; Nguyen et al. 2005; De Marchis et al. 2009)과 도입 유전자가 포함된 모든 색소체 계층 copy가 homoplasmic한 형질전환체를 얻는데 어려움이 있으며 (Khan and Maliga. 1999), 엽록체 이외의 과실이나 뿌리, 저장기관에 분포하는 chromoplast, leucoplast, amyloplast 등과 같은 색소체에서는 유전자의 발현이 극히 낮은 (Sidorov et al. 1999) 문제점을 가지고 있다.

엽록체 형질전환의 장점은 1-2 카피 유전자를 가지는 핵 형질전환에 비해 수많은 카피수를 가지기 때문에 엽록체에서의 외래 유전자 발현 수준을 획기적으로 높일 수 있다 (De Cosa et al. 2001). 상동 재조합 (homologous recombination) 방식으로 엽록체 계층에 외래 유전자가 도입되기 때문에 핵 형질전환 시 종종 나타나는 위치효과

S. R. Min · W. J. Jeong · J. H. Park · J. I. Lyu · J. H. Lee · K. H. Oh · J. R. Liu (✉)
한국생명공학연구원 식물시스템공학연구센터
(Plant Systems Engineering Research Center)
e-mail: jrliu@kribb.re.kr

H.-J. Chung
(주)젠닥스
(GenDocs Inc., 544-1 Bongmyung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-301, Korea)

(position effect)나 유전자 침묵 (gene silencing)이 없어 외래 유전자 발현이 용이하다 (De Cosa et al. 2001; Daniell et al. 2002; Lee et al. 2003). 또한, 엽록체는 원핵세포 유래의 세포 소기관으로 다수의 외래유전자를 오픈된 형태로 엽록체 계층에 동시 발현시킬 수 있다 (Bock 2001; Jeong et al. 2004). 더욱이 대부분 고등식물의 색소체는 모계 유전을 하기 때문에 (Daniell 2002) 화분을 통한 외래 유전자가 생태계 야생종으로의 수평 이동 가능성을 근원적으로 차단할 수 있어 환경친화적이다 (Daniell 2002, 2007).

본 연구실에서도 고등식물의 엽록체 형질전환 장점을 인식하고 (Chung et al. 2006; Min et al. 2010) 엽록체 형질전환 연구를 수행하고 있다. 담배와 *Nicotiana benthamiana* (Jeong et al. 2004; Davarpanah et al. 2009)에서 GFP 단백질을 발현하였으며, human serum albumin (HSA) 및 human β -site APP cleaving enzyme (BACE)을 담배에 도입하기도 하였다 (Ko et al. 2006; Youm et al. 2010). 또한, 이차 상동 재조합을 방지하는 색소체 형질전환 벡터 (Liu et al. 2006)를 개발하여, *Synechocystis* 및 원핵생물 유래 광합성 관련 유전자 등 여러 유용 유전자들을 담배 및 감자 엽록체에 도입하여 현재 형질전환체의 특성 분석을 수행중이다.

향후 농업적으로 유용한 특성을 가진 유전자의 엽록체 형질전환을 통하여 고부가가치 작물을 개발하고 고가의 단백질, 의약품 치료제 등과 같은 유용물질을 생산하는 식물공장으로써 엽록체 이용 가능성을 제시하고자 감자의 엽록체 형질전환 시스템을 확립하였다.

재료 및 방법

감자의 엽록체 형질전환

본 연구에 사용된 엽록체 형질전환 벡터는 *Prrn-aadA-mgfp-IpsbA*가 담배 엽록체의 *trnI-trnA* 사이에 들어있는 CtVG (Jeong et al. 2007) 벡터를 사용하였다 (Fig. 1A). 줄기 번식방법으로 기내 배양된 배양 3~4주째의 감자 (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) 잎을 bombardment 하루 전 항생제가 첨가되지 않은 캘러스 유도배지 [MS (1962) salts + B5 vit+ 3% suc + 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L Zeatin + 0.6% Phytoagar, pH 5.7]에 잎 뒷면 (abaxial)이 위로 향하게 전처리 배양하였다. Biolistic particle delivery system (PDS 1000/He; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 엽록체 형질전환을 수행하였다. 미리 준비된 gold particle (0.6 μ m)에 CtVG DNA (1 μ g/shot), 2.5 M CaCl₂, 100 mM spermidine을 차례로 첨가하여 코팅한 후 1,100 psi, 28 in.Hg 압력 및 6 cm 높이에서 전처리 배양된 감자 잎에 bombardment 하였다. Bombardment 후 페트리디쉬를 25°C, 약한 빛에서 2일 배양 후, 약 3 mm x 3 mm 크기로 잘라 잎 뒷면이 배지에

닿도록 캘러스 선발배지 (MS salts + B5 vit + 3% suc + 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L Zeatin + 300 mg/L spectinomycin + 0.6% Phytoagar, pH 5.7)에 치상하여 약 40 μ mol·m⁻²·sec⁻¹ cool-white 형광, 16시간 광주기 조건에서 배양하였다. 배양 1개월 후 잎 절편체를 캘러스 증식배지 (MS salts + B5 vit+ 3% suc + 3 mg/L Zeatin + 2 mg/L IAA + 1 mg/L GA₃ + 300 mg/L spectinomycin + 0.6% Phytoagar, pH 5.7)로 옮겨 3주 간격으로 계대배양 하였고 형성된 캘러스는 homoplasmy level을 높이고자 2~3회 계대배양을 통하여 증식되었다. 증식된 캘러스는 식물체 재분화배지 (MS including vit + 3% suc + 2 mg/L Zeatin + 0.01 mg/L NAA + 0.1 mg/L GA₃ + 300 mg/L spectinomycin + 0.6% Phytoagar, pH 5.7)에서 식물체로 재분화 시킨 후, 발근 배지 (MS including vit + 3% suc + 300 mg/L spectinomycin + 0.6% Phytoagar, pH 5.7)에서 뿌리를 유도하였다. 발근된 식물체는 순화과정을 거쳐 온실에서 2~3개월 동안 생육시킨 후 수확하였다.

엽록체 형질전환체의 GFP 발현

엽록체 형질전환 식물체의 GFP 형광을 관찰하기 위하여 감자 잎의 표피를 벗겨낸 뒤 enzyme solution (1~1.5% Cellulase R10, 0.2~0.4% Macerozyme R10, 0.4 M Mannitol, 20 mM MES, pH 5.7, 0.1% BSA)에 넣고 암상태에서 3~4시간 처리한 후 형광 현미경을 통해 관찰하였다. 또한 식물체 수준에서 GFP 발현 관찰을 위해 순화된 식물체를 MultiDoc-It Digital Imaging System (UVP, CA, USA)을 이용하여 관찰하였다.

엽록체 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석

엽록체 형질전환체의 유전자 도입, 발현 분석을 위하여 PCR, Southern, northern blot 분석을 수행하였다. 토양 순화된 식물체의 잎에서 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. PCR 분석은 담배 엽록체의 *trnI* FI (5'-CCGTAGGTGCGATGATTTACTTC-3'), *trnA* RA (5'-AGAGTCTTTCAGTGGCACGTTTC-3') primer를 이용하여 도입 유전자가 엽록체 genome에 도입되었는지를 확인하였고, *aadA*, *gfp* 유전자 특이 primer도 사용하여 확인하였다. 5 μ g의 genomic DNA를 *Bgl*III 제한효소로 분해하여 Southern 분석을 수행하였고, *trnA* F1 (5'-TGCGAT TACGGGTTGGATGT-3'), *trnA* R1 (5'-GTTCTTGACAGCCCAT CTTT-3') primer를 가지고 CtVG를 주형으로 PCR을 수행한 후 약 150 bp 크기의 *trnA*-specific DNA fragment와 *aadA* PCR 산물을 각각 probe로 사용하여 Random Primed DNA Labeling kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 이용하여 [α -³²P]dCTP로 labeling하여 사용하였다. RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)을 이용하여 total RNA를 분리한 후

gfp 유전자의 PCR 산물을 probe로 이용하여 5 µg total RNA를 northern 분석하였다. Southern 및 northern 분석에 사용된 hybridization 이후의 과정은 Min et al. (2009)의 방법과 동일하게 수행하였다.

Immunoblot 분석

엽록체 형질전환체의 잎, 뿌리 및 기내 소과경으로부터 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 8 mM MgCl₂, 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), 1x COMPLETE protease inhibitor mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)가 첨가된 buffer를 이용하여 total soluble protein을 추출하였다. 10 µg 단백질을 12% SDS-polyacrylamide gels에서 전기영동하여 PVDF membrane에 전이하였고 anti-GFP monoclonal antibody (JL-8; Clontech)와 ECL-Plus Western blotting Detection system (GE Healthcare)을 이용하여 GFP 단백질을 detection 하였다.

결과 및 고찰

감자 엽록체 형질전환체 생산

CtVG 벡터를 이용하여 감자 엽록체 형질전환체를 생산하였다 (Fig. 1B). Bombardment된 감자 잎 절편체는 배양 약 6~8주 후에 bleached된 잎 절편체로부터 녹색의 캘러스가 형성되었다 (Fig. 1Ba, b). Homoplasmic level을 높이기 위하여 캘러스 증식배지에서 2~3회 계대배양을 통하여 증식 (Fig. 1Bc)한 후 식물체 재분화 배지로 옮겨주었을 때 약 4~6주 후에 캘러스로부터 식물체로 재분화되었으며 (Fig. 1Bd) 재분화된 식물체는 발근배지에서 정상적으로 뿌리가 유도되었다 (Fig. 1Be). 발근 식물체는 순화과정을 거쳐 온실에서 2~3개월 생육시킨 후 과경을 수확하였다 (Fig. 1Bf). 엽록체 형질전환 과정을 거쳐 생성된 식물체는 wild type과 유사한 표현형을 보였으며 모양에서 형성된 과경의 크기와 형태를 비교해 볼 때 wild type은 대체적으로 둥근 형태의 과경을 형성하였지만 CtVG 엽록체 형질전환체의 경우는 상대적으로 더 긴 형태의

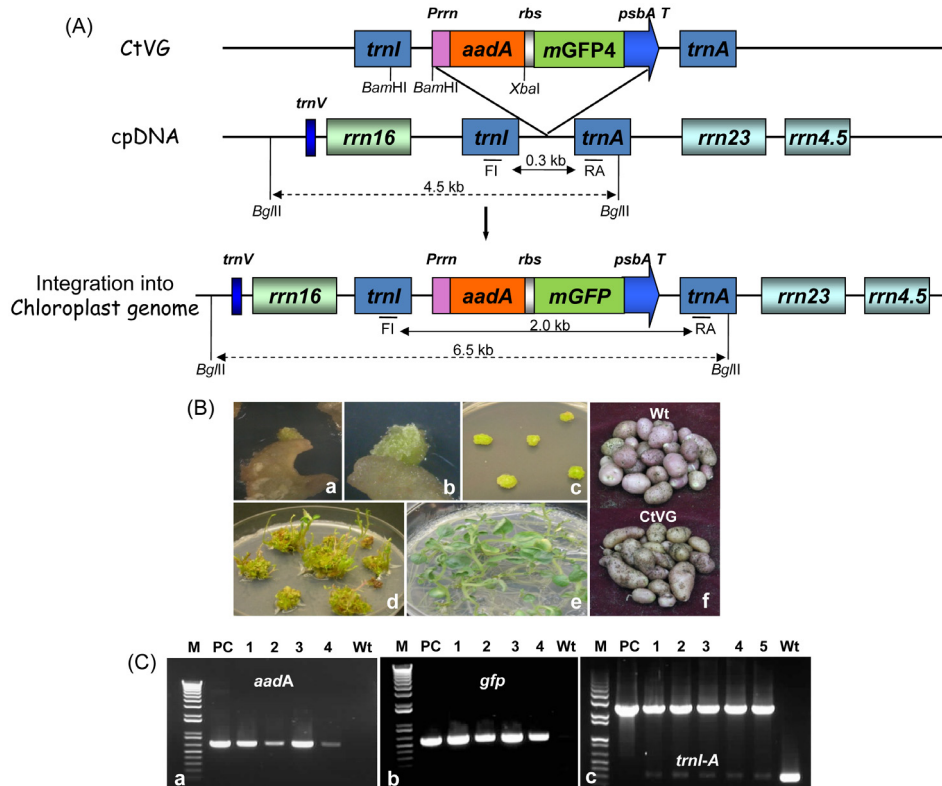


Fig. 1 Introduction of the GFP gene into the potato plastome. (A) Construction of the chloroplast transformation vector. The *trnI* and *trnA* genes were used as flanking sequences for homologous recombination. *Prrn*, promoter region of 16S rRNA gene; *aadA*, aminoglycoside 3' adenylyltransferase gene for spectinomycin resistance; *rbs*, ribosome binding site; *mGFP4*, modified GFP4 gene; *psbAT*, terminator region of *psbA* gene. PCR primers are marked as FI and RA with short lines and *Bgl*II restriction sites are indicated with the expected size. (B) Production of transplastomic potato plants. a-b: primary selection of chloroplast transformed callus after incubation for 8 weeks, the leaf explants are bleached due to effective inhibition of plastid protein synthesis by spectinomycin; c: proliferation of transgenic calluses on 300 mg/L spectinomycin medium; d-e: plants regeneration from spectinomycin resistant calluses; f: tuber production from Wt and CtVG transgenic plant. (C) PCR analysis of transplastomic plants

괴경을 형성하였다 (Fig. 1Bf).

항생제 첨가 배지에서 재분화된 식물체의 목표 유전자 도입 여부를 확인하기 위하여 각 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 엽록체 벡터 특이적인 *trnI*와 *trnA* primer, 도입유전자 특이적인 *aadA* 및 *gfp* primer를 이용하여 PCR 분석을 수행하였다. 그 결과, 감자의 엽록체 형질전환체에서는 *aadA* 및 *gfp* 유전자가 도입되었음을 알 수 있었으며 (Fig. 1Ca, b), 벡터 특이적인 primer인 *trnI-trnA*를 사용하여 PCR 수행하였을 경우 감자의 엽록체 게놈 내에 homologous recombination을 통하여 유전자가 삽입됨을 알 수 있었다 (Fig. 1Cc).

본 연구에서는 *Prnr-aadA-mgfp-TpsbA*가 담배의 *trnI-trnA* 부위 사이에 들어있는 CtVG 벡터를 이용하여 엽록체 형질전환을 수행한 결과 총 95개 plate중에서 spectinomycin에 저항성을 나타내는 18개의 녹색 캘러스를 선발하였으며 그 가운데 식물체로 분화된 13개체에서 모두 PCR positive 반응을 보여 약 13.7%의 형질전환 효율을 보였다 (Table 1).

엽록체 형질전환체의 GFP 발현

엽록체 형질전환된 감자 식물체에 도입된 *gfp* 유전자의 발현을 관찰하기 위하여 잎에서 원형질체를 분리하여 형광현미경하에서 GFP의 발현을 관찰한 결과, wild type의 원형질체에서는 GFP 발현을 전혀 볼 수 없었으나 CtVG 형질전환체에서는 원형질체의 모든 엽록체에서 강한 GFP 발현을 보여주었다 (Fig. 2A). 또한, 세포수준이 아닌 식물체 전체 수준에서의 GFP 발현을 관찰한 결과에서도 같은 양상을 보였다 (Fig. 2B).

엽록체 형질전환체의 유전자 도입 및 발현 분석

PCR로 유전자 도입이 확인된 식물체를 대상으로 *aadA*와 *trnA* probe로 이용하여 Southern blot 분석을 수행하였다. *aadA*를 probe로 이용하였을 경우 wild type에서는 전혀 밴드가 검출되지 않았지만 형질전환체에서는 약 6.5 kb의 밴드가 검출되었다 (Fig. 3A). 또한, *trnA* probe를 사용하였

Table 1 Results of chloroplast transformation experiments using the CtVG plasmid DNA in potato

Experiment	No. of plates bombarded	No. of Spec ^r green callus	No. of Spec ^r shoots	No. PCR positive shoots	Transformation efficiency ^a (%)
1	29	2	2	2	6.9
2	28	12	11	11	39.3
3	20	1	0	0	0
4	18	3	0	0	0

^aNo. of PCR⁺ shoots x No. of plates bombarded⁻¹ x 100

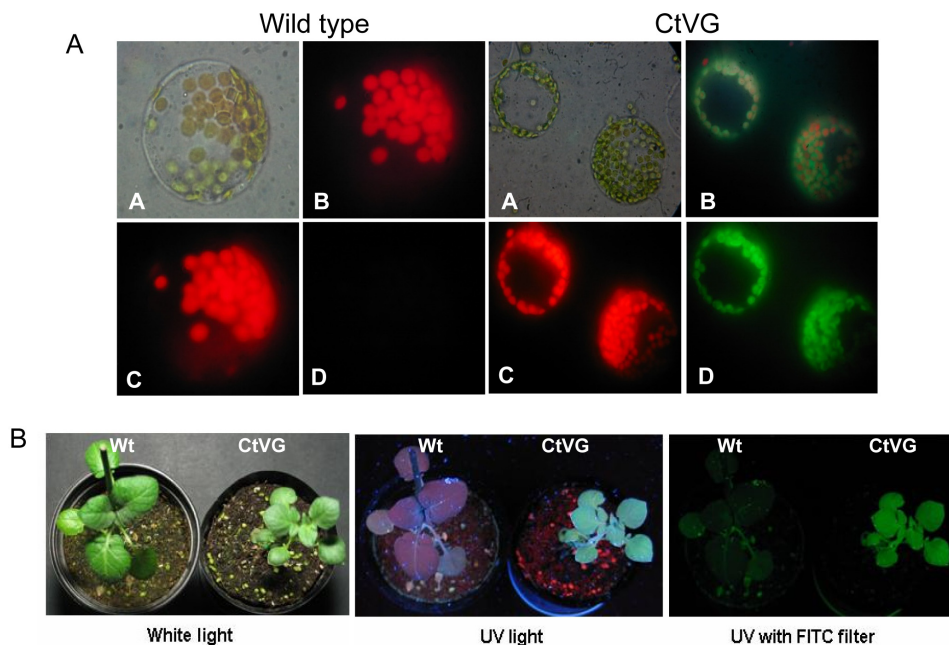


Fig. 2 GFP expression in chloroplasts and whole plants from non-transgenic and transplastomic potato plants. A, Expression of GFP was monitored by a fluorescence microscopy. (A) bright field; (B) merged GFP and chlorophyll autofluorescence under the UV light; (C) chlorophyll autofluorescence image; (D) GFP under the UV light; B, GFP expression under Multidoc-It Digital Imaging System

을 경우 wild type에서는 4.5 kb에서 DNA 밴드가 검출이 된 반면, 엽록체 형질전환체에서는 *aadA*와 *gfp* 유전자가 감자 plastid genome의 *trnI*와 *trnA* 사이에 도입되었음을 나타내는 대략 6.5 kb 밴드가 검출되었다 (Fig. 3B). 이들 결과로부터 엽록체 형질전환체에서는 wild type에 해당하는 4.5 kb 크기의 밴드가 검출되지 않음으로써 이들 엽록체 형질전환 식물체는 감자 엽록체 게놈에 목표 유전자가 homoplasic 상태로 도입되었음을 알 수 있었다. 한편, 기내 소피경을 파종하여 얻은 괴경을 다시 토양에 심은 세대에서도 *gfp* 유전자 삽입을 확인하였으므로 이는 *gfp* 유전자가 세대를 통하여 전이되었음을 알 수 있었다 (테이 터미제시).

유전자 삽입이 확인된 형질전환 식물체에서 도입 유전자의 발현을 알아보기 위하여 *gfp* probe를 이용하여 northern blot 분석을 수행한 결과, wild type에서는 *gfp* 유전자가 전혀 발현되지 않았지만 엽록체 형질전환체에서는 약 1.7 kb 크기의 major transcripts 가지는 강한 *gfp* 밴드를 확인할 수 있었다 (Fig. 4A). 그 위에 보이는 약 4.4 kb 크기의 minor 밴드는 endogenous 16S rRNA 프로모터에 의

한 read-through transcription을 통하여 *gfp* 유전자에 hybridizing 되며 나타난 것으로 추측되며 이런 현상은 엽록체 형질전환체의 northern 분석 시 흔히 보고되었다 (Davaranah et al. 2009; Youm et al. 2010; De Machis et al. 2009).

한편, 단백질 수준에서 목표 유전자의 발현을 확인하고자 immunoblot 분석을 수행한 결과 형질전환체의 잎에서 약 27 kDa의 GFP가 강하게 발현되었으나 뿌리나 기내 소피경의 경우 아주 약하게 발현되고 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 4B). 이는 leucoplast 및 amyloplast와는 달리 엽록체에서의 transcription과 translation이 훨씬 더 활발하기 때문에 감자 괴경의 amyloplast 보다 잎에서의 *gfp* 축적이 약 100배 높았다는 결과 (Sidorov et al. 1999; Davaranah et al. 2009)와 일치하였다.

대부분 고등식물의 16S rRNA, *trnI*, *trnA* 및 23S rRNA를 포함하는 ribosomal RNA operon 부위는 highly conserved 되어 있기 때문에 담배와 같은 가지과에 속하는 감자에 적용할 수 있지만 감자 유래 *trnI-trnA*를 사용하면 현재보다 엽록체 형질전환 효율을 높일 수 있을 것이다. 최근, 감자의 식물체 재분화 과정을 개선하고 감자의 flanking sequences를 포함하는 새로운 벡터를 개발하여 감자의 엽록체 형질전환에 이용함으로써 형질전환 효율 및 괴경에서의 유전자 발현 증가를 꾀하기도 하였다 (Valkov et al. 2011).

본 연구에서는 앞서 감자의 엽록체 형질전환 성과를 발표한 Sidorov et al. (1999), Nguyen et al. (2005), Valkov (2011)와 기본적으로 대등한 결과를 나타내었다. 본 연구에서 사용한 엽록체 형질전환 벡터 CtVG는 CtV2 (Guda et al. 2000)를 변형한 것이나 transgene이 dicistronic으로 발현될 수 있도록 함으로써 향후 두 개 이상의 유전자를 동시에 도입하고자 할 때 이점을 발휘할 수 있을 것이다. 또한 transgene을 감자에서는 최초로 *trnI*와 *trnA* 사이에 도입하여 외래 유전자를 발현시킴으로써 엽록체 형질전환 기술 이용 가능성의 폭을 넓혔다. 본 연구에서 확립된 감자 엽록체 형질전환 시스템을 이용하여 유용 유전자를 도입함으로써 농업적 형질을 개선하거나 고부가가치 단

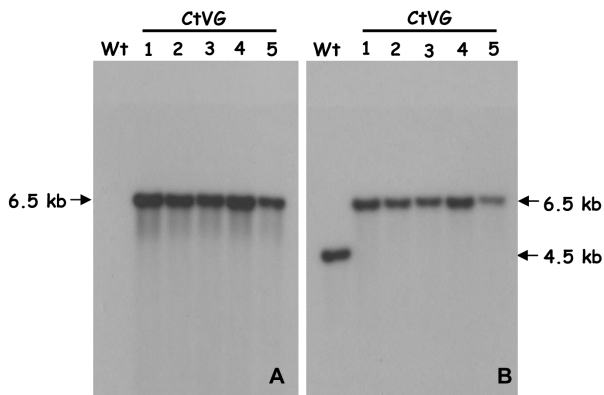


Fig. 3 Southern blot analysis of CtVG transplastomic potato plants. Total genomic DNA (5 μ g) was digested with *Bgl*III, and hybridized with *aadA* (A) and *trnA* (B) probes, respectively. *TrnA* probe gives 4.5 kb of wild type gene and 6.5 kb of transgene

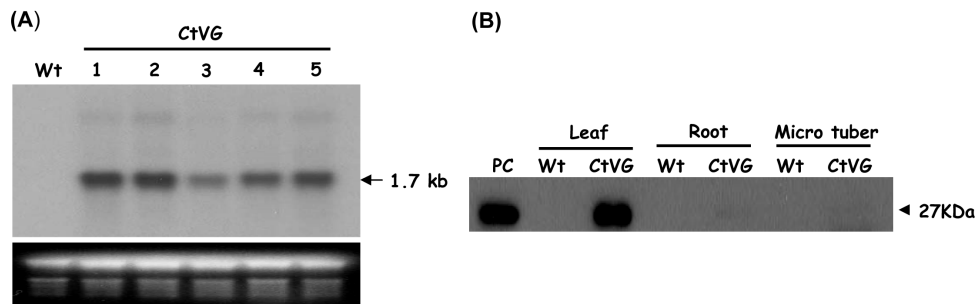


Fig. 4 GFP expression and accumulation in potato plastid. (A) Northern blot analysis of *gfp* transcript accumulation in transplastomic plants. The 5 μ g of total RNA was separated on 1.2% formaldehyde gel and hybridized with *gfp* probe. Lower panel was EtBr-stained RNA gel. (B) Immunoblot analysis of GFP production from leaf, root, and micro tuber in transplastomic potato

백질을 대량생산하는 감자를 보다 효율적으로 개발 할 수 있을 것이다.

적 요

고등식물의 엽록체 유전공학은 핵 형질전환과 비교해 볼 때 여러 가지 독특한 장점을 가진다. 높은 transgene 발현율, 상동 재조합에 의한 site-specific transgene의 삽입으로 인해 유전자의 position effect가 없으며, 단일 형질전환으로 동시에 여러 유전자의 도입이 가능하고 모계 유전으로 인해 화분 방출 위험을 감소시킬 수 있다. 담배 specific한 pCtVG (*trnI-Prrn-aadA-mgfp-TpsbA-trnA*) 벡터를 이용하여 안정적인 감자 엽록체 형질전환 시스템을 개발하였다. 감자 엽록체 계층으로 외래유전자의 삽입과 homoplasmic level은 PCR과 Southern blot 분석으로 확인하였다. Northern과 immunoblot 분석 및 GFP fluorescence imaging을 통하여 엽록체 형질전환체의 앞에서 GFP 유전자가 강하게 발현, 축적됨을 알 수 있었다. 본 연구에서 확립된 감자 엽록체 형질전환 시스템을 이용하여 유용 유전자를 도입함으로써 농업적 형질을 개선하거나 고부가가치 단백질을 대량 생산하는 감자를 보다 효율적으로 개발할 수 있을 것이다.

사 사

본 논문은 교육과학기술부 프론티어 작물유전체기능연구사업, 해양수산기술진흥원 해양극한생물 분자유전체 연구단사업, 한국생명공학연구원 기관고유사업의 지원으로 수행되었다.

인용문헌

- Bock R (2001) Transgenic chloroplast in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol* 312:425-438
- Chung HJ, Suh YB, Jeong WJ, Min SR, Liu JR (2006) Chloroplast genetic transformation in higher plants: an encounter between prokaryote and eukaryote. *J Plant Biotechnol* 33:185-194
- Daniell H (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat Biotechnol* 20:581-586
- Daniell H (2007) Transgene containment by maternal inheritance: effective or elusive? *Proc Natl Acad Sci USA* 104:6879-6880
- Davarpanah SJ, Jung SH, Kim YJ, Park YI, Min SR, Liu JR, Jeong WJ (2009) Stable Plastid Transformation in *Nicotiana benthamiana*. *J Plant Biol* 52:244-250
- 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
- De Marchis F, Wang Y, Stevanato P, Arcioni S, Bellucci M (2009) Genetic transformation of the sugar beet plastome. *Transgenic Res* 18:17-30
- Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, Peltier G, Ferullo JM, Tissot G (2004) Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol Biol* 55:479-489
- Guda G, Lee SB, Daniell H (2000) Stable expression of a biodegradable protein-based polymer in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Rep* 19:257-262
- Hou BK, Zhou YH, Wan LH, Zhang ZL, Shen GF, Chen ZH, Hu ZM (2003) Chloroplast transformation in oilseed rape. *Transgenic Res* 12:111-114
- 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, Min SR, Liu JR (2007) Enhancement of chloroplast transformation frequency by using mesophyll cells containing a few enlarged chloroplasts from nuclear transformed plants in tobacco. *J Plant Biotechnol* 34:271-275
- Khan MS, Maliga P (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol* 17:910-915
- Ko SM, Kim HC, Yoo BH, Woo JW, Chung HJ, Choi DW, Liu JR (2006) Production of human serum albumin in chloroplast-transformed tobacco plants. *J Plant Biotechnol* 33:233-236
- Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004a) Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol* 136:2843-2854
- Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004b) Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol Biol* 56:203-216
- Lee SB, Kwon HB, Kwon SJ, Park SC, Jeong MJ, Han SE, Byun MO, Daniell H (2003) Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers tolerance. *Mol Breed* 11:1-13
- Lee SM, Kang K, Chung H, Yoo Sh, Xu XM, Lee SB, Cheong JJ, Daniell H, Kim M (2006) Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. *Mol Cells* 21:401-410
- Lelivelt CL, McCabe MS, Newell CA, de Snoo CB, van Dun KM, Birch-Machin I, Gray JC, Mills KH, Nugent JM (2005) Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Mol Biol* 58:763-774
- Liu CW, Lin CC, Chen J, Tseng MJ (2007) Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) by particle bombardment. *Plant Cell Rep* 26:1733-1744
- Liu JR, Jeong WJ, Chung HJ, Min SR, Park JY (2006) Plastid transformation system to prevent the intramolecular recombination of transgene. *PCT/2006/004377*
- Min SR, Kim JW, Jeong WJ, Lee YB, Liu JR (2009) Development of transgenic sweet potato producing human lactoferrin. *J Plant Biotechnol* 36:224-229
- Min SR, Jeong WJ, Kim SW, Lee JH, Chung H-J, Liu JR (2010)

- Current status on plant molecular farming via chloroplast transformation. *J Plant Biotechnol* 37:275-282
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nguyen TT, Nugent G, Cardi T, Dix PJ (2005) Generation of homoplasmic plastid transformants of a commercial cultivar of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Science* 168:1495-1500
- Nugent GD, Coyne S, Nguyen TT, Kavanagh TA, Dix PJ (2006) Nuclear and plastid transformation of *Brassica oleracea* var, *botrytis* (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplast. *Plant Sci* 170:135-140
- Okumura S, Sawada M, Park Y, Hayashi T, Shimamura M, Takase H, Tomizawa KI (2006) Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts. *Transgenic Res* 15:637-646
- Ruf S, Hermann M, Berger LJ, Carrer H, Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol* 19:870-875
- Ruhlman T, Ahangri R, Devine A, Samsam M, Daniell H (2007) Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplast-oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnol J* 5:495-510
- Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PTJ, Staub JM, Nehra NS (1999) 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, Maliga P (1998) Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 18:20-24
- Singh AK, Verma SS, Bansal KC (2010) Plastid transformation in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Transgenic Res* 19:113-119
- Skajinskaia M, Svab Z, Maliga P (2003) Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicacea. *Transgenic Res* 12:115-122
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8526-8530
- Valkov VT, Gargano D, Manna C, Formisano G, Dix PJ, Gray JC, Scotti N, Cardi T (2011) High efficiency plastid transformation in potato and regeneration of transgene expression in leaves and tubers by alternative 5' and 3' regulatory sequences. *Transgenic Res* 20:137-151
- Wang HH, Yin WB, Hu ZM (2009) Advances in chloroplast engineering. *J Genet Genomics* 36:387-398
- Youm JW, Jeon JH, Kim H, Min SR, Kim MS, Joung H, Jeong WJ, Kim HS (2010) High-level expression of a human β -site APP cleaving enzyme in transgenic tobacco chloroplasts and its immunogenicity in mice. *Transgenic Res* 19:1099-1108
- Zubko MK, Zubko EI, Zuilen KV, Meyer P, Day A (2004) Stable transformation of petunia plastids. *Transgenic Res* 13:523-530