

叶绿体基因组研究进展*

邢少辰¹⁾ CLARKE JIHONG LIU^{2)**}

¹⁾ 吉林省农业科学院生物技术研究中心, 长春 130124;

²⁾ Department of Genetics and Biotechnology, Plant Health & Protection Division,
Norwegian Institute for Agricultural & Environmental Research, N-1432 Ås, Norway)

摘要 作为植物细胞器的重要组成部分和光合作用的器官, 叶绿体在生物进化的漫长历史中发挥了重要作用. 伴随着生物技术的深入发展, 人们发现叶绿体基因组结构和序列的信息在揭示物种起源、进化演变及其不同物种之间的亲缘关系等方面具有重要价值. 与此同时, 比核转化具有明显优势的叶绿体转化技术在遗传改良、生物制剂的生产等方面显示出巨大潜力, 而叶绿体基因组结构和序列分析则是叶绿体转化的基石. 基于叶绿体的这些重要作用, 收集整理有关的资料, 从几个方面归纳了本领域最近的研究进展, 希望能使读者对迅速发展的叶绿体基因组研究有更全面的了解, 以及对叶绿体基因组在物种的进化、遗传、系统发育关系等方面的作用有更深刻的认识, 同时也希望对叶绿体转化技术的研究和广泛应用产生积极作用.

关键词 叶绿体基因组, 起源, 进化, 转化, 进展

学科分类号 Q11, Q7, Q93

叶绿体是质体的一种, 因为绿色而得名, 普遍存在于陆地植物、藻类和部分原生生物当中, 是细胞内具有自主遗传信息的重要细胞器. 由于光合作用发生在叶绿体内, 因而成为推进早期生命进化的能量源头, 全面了解叶绿体基因组及其在生物进化中的作用, 对今后深入研究和充分发挥叶绿体功能具有重要意义.

近年来, 随着分子生物学, 尤其是大规模测序技术的不断发展, 对叶绿体基因组的研究日益深入. 从1986年首次获得烟草(*Nicotiana tabacum*)^[1]和地钱(*Marchantia polymorpha*)^[2]叶绿体基因组的完整序列以来, 叶绿体基因组数据库迅速增加充实. 2005年有45个基因组序列, 2006年底已经公布了包括生物界不同物种的叶绿体基因组数据82组, 这其中包括同一个种的不同亚种, 例如水稻种(*Oryza sativa*)就有野生稻(*Oryza nivara*)、粳稻(*Oryza sativa japonica cultivar-group*)和籼稻(*Oryza sativa indica cultivar-group*)3个亚种^[3~5]. 虽为同种, 但亚种之间的叶绿体基因组序列有部分不同, 反映了它们之间在进化方面存在差异. 叶绿体基因组数据库的迅速充实说明本领域的研究正在被逐步重视, 同时也为揭示叶绿体基因组进化理论提供了更具说服力的证据. 叶绿体转化正在成为继核转化之后又一个非常

有效的新技术. 与核转基因技术相比, 叶绿体转化具有明显的优势, 主要表现在以下几个方面: a. 表达效率高且外源基因可以定位整合; b. 可以直接表达来自原核的功能基因; c. 多基因可以同时转化, 提高转化效率; d. 没有载体序列、位置效应和多效性; e. 没有核转化中经常出现的基因沉默现象; f. 属于母性遗传, 后代材料稳定; g. 可有效控制花粉漂移造成的基因污染, 环境安全性高等一系列优势. 研究叶绿体基因组的进化可以更深入地了解不同植物之间的亲缘关系, 叶绿体基因的转录、剪切、表达规律以及与核基因组之间的信息交流等, 为载体设计、提高转化后同质化效率等提供有利信息^[6].

本文在前人广泛而深入研究的基础上, 搜集整理了这个领域的最新成果, 结合本文作者在这个领域的研究工作, 旨在使大家进一步了解叶绿体基因组目前的研究现状和今后的发展趋势. 鉴于叶绿体转化技术是外源基因依靠插入特异位点后进行重组, 所以研究叶绿体基因组将为我们今后有效利用

* 国家转基因植物中试与产业化基地资助项目(J00-B-003).

** 通讯联系人.

Tel: 047-92609264, E-mail: jihong.liu-clarke@bioforsk.no

收稿日期: 2007-05-28, 接受日期: 2007-07-02

叶绿体转化起重要作用。

1 叶绿体基因组的结构特征

叶绿体基因组DNA(chloroplast DNA, cpDNA)一般为双链环状分子, 极少数为线状, 如伞藻(*Acetabularia*)。叶绿体基因组的大小差别也比较大, 如微管植物叶绿体DNA一般为120~160 kb, 其中被子植物120 kb, 裸子植物如银杏(*Jinkgo biloba*)为158 kb, 石松(*Huperzia lucidula*)为154 kb, 蕨类植物为140~150 kb, 苔藓类如地钱为120 kb。藻类尤其是绿藻的叶绿体基因组DNA的变

化很大, 小的只有37 kb, 如一种寄生性的绿藻(*Helicosporidium sp.ex Simulium jonesii*), 而伞藻的叶绿体基因组则高达2 000 kb^[7]。

目前的研究结果表明, 叶绿体基因组的结构非常保守。图1所示为烟草叶绿体基因组结构^[1], 双链环形DNA有4个基本部分组成, 分别是大单拷贝区(large single copy region, LSC), 小单拷贝区(small single copy region, SSC), 反向重复区A(inverted repeat region A, IR_A)和反向重复区B(inverted repeat region B, IR_B)。2个IR区域的序列相同, 但方向相反。

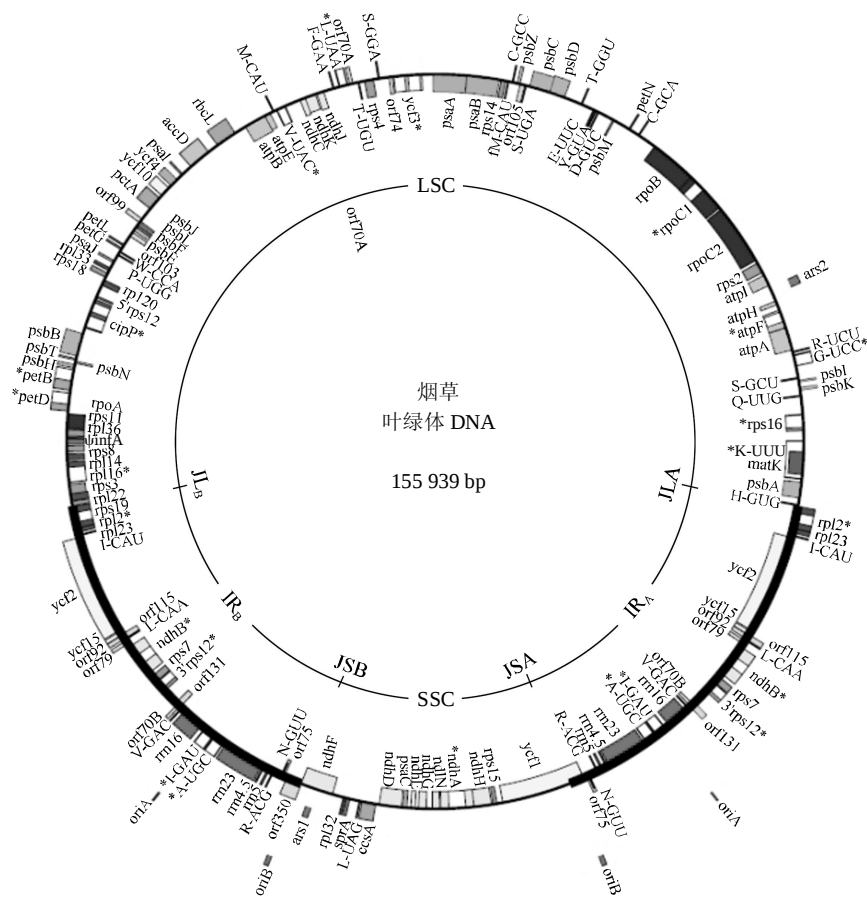


Fig. 1 Gene map of tobacco chloroplast genome^[1]

图1 烟草的叶绿体基因组图谱^[1]

内圈显示了基因组的4个主要组成部分; 外部表示不同的基因。

在漫长的演变进化过程中, 这几个部分的结构顺序保持不变, 不同物种叶绿体基因组之间的差异主要表现在IR区域的长度和方向变化上。在长度变化上, 裸子植物如日本黑松(*Pinus thunbergii*)的IR区间已经萎缩成仅有的495 bp, 而一些豆科植物如豌豆(*Pisum sativum*)和剪叶苜蓿(*Medicago*

truncatula)的IR区间甚至已经完全消失了^[8]。与此形成对比的是IR区域长度的增加, 如天竺葵(*Pelargonium hortorum*)在进化过程中, IR区段增加成了76 kb, 纤细裸藻(*Euglena gracilis*)含有3个方向相同的串联重复DNA。IR区域的方向上同样存在变化, 紫红紫菜(*Porphyra purpurea*)中的IR为同

向重复, 而条斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)则为反向重复. 由于在某些藻类中发现了退化的疑似IR结构, 由此推测, 一些含有多个重复IR序列的低等生物, 一部分物种在进化过程中逐步丢失了IR区段. 人们原来认为IR重复序列是古生物叶绿体基因组的一个十分明显的结构特征, 但是研究结果表明, 有些物种不具备这个结构特征, 其生长状态也很好, 没有受到任何可见的影响, 说明IR区段不是叶绿体功能的必需部分, 或者说此区段起码不一定总是必需的, 可能在进化过程中得失过多次^[9].

叶绿体基因组中含有大量的功能基因, 可分成3类, 即和光合作用有关基因, 和基因表达本身有关的基因和其他生物合成有关的基因. 从IR区域分布的基因种类上说, 此区段主要分布着编码rRNA的基因(rps), 包括编码16 S和23 S, 中间被编码4.5 S和5 S 2个tRNA的基因(trn)分开, 还有些基因的功能未知(ycf基因)^[10]. 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此区域, 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.

在LSC和SSC区域分布的主要是与光系统 I (psa)、光系统 II (psb)有关的基因, 此外还包括编码Rubisco大亚基(rbcL)和小亚基的基因(rbcS)、tRNA的基因(trn)、ATP酶基因(atp)、NADH质体醌氧化还原酶基因(ndh)和RNA聚合酶基因(rpo)等. 不同物种叶绿体所包含的基因数量和种类会有较大的变化, 例如编码Rubisco小亚基和藻红、藻蓝蛋白的基因是藻类所特有的基因, 其中与光合作用、特异蛋白质等相关的基因具有潜在的基础研究和生产应用价值, 尤其值得关注^[10].

2 叶绿体基因组的进化

2.1 起源研究

关于叶绿体的起源, 目前大家普遍认可的是“内共生”理论(endosymbiotic theory)^[11], 即叶绿体来源于原始的古细菌蓝藻(cyanobacterium). 在这次事件中, 具备光合能力的蓝藻首先被没有光合能力的单细胞真核原生生物吞噬, 进一步被控制, 最终形成相互依赖关系, 逐步演化成后面3个主要种群, 即绿藻(green algae)、红藻(red algae)和褐藻(glaucophyte algae), 其中部分藻类还进行了第2次共生, 第3次共生, 甚至第4次共生. 这3个种群之间的关系还不是十分清晰, 但褐藻一个明显的特征是其叶绿体结构中二层胞膜之间还保留来自祖先蓝

藻的肽聚糖壁的遗迹, 而另外2个种群则没有保留下来. 通过分析一种褐藻(*Cyanophora paradoxa*)叶绿体编码的蛋白质序列, 发现这种褐藻比绿藻和红藻的分化时间要早. 最古老的真核生物种群化石证明, 红藻的首次出现大约是在一亿二千万年前, 支持此学说的证据还包括发现了一种光合细胞器蓝小体, 结构类似蓝藻, DNA和叶绿体相似, 是介于二者之间的一种过渡结构. 除此之外, 叶绿体细胞分裂的机制还部分类似于其原核生物的祖先^[12].

2.2 基因的转移和丢失

在不同的共生事件中, 大量共生体基因转移到寄主细胞的核基因组中, 这个过程发生的时间跨度上千万年, 而且系统发生学研究证明这个过程仍然在进行当中. 实际上, 我们经常可以在植物的核基因组里发现叶绿体基因的片段, 如在烟草、水稻等植物中都发现了基因转移的证据^[13~15], 而拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)核基因组序列则揭示了高达18%的基因是祖先蓝藻通过内共生途径转移到核里的^[16].

在基因转移的同时, 也有很多基因发生了丢失, 如被子植物里的accD, ycf1, ycf2, rpl23, rpl22, infA, rps16, ycf4等基因都部分或者全部从豆科植物中的叶绿体基因组丢失了, 有的基因(如infA)的丢失甚至还发生了多次^[17]. 有些转移并整合到核基因组的基因, 如rpl22和rpoA, 其编码的蛋白质以转移肽的方式从核内运输到叶绿体中执行功能^[18, 19], 而菠菜(*Spinacia oleracea*)中一个假基因rpl23的功能则被核内的基因所替代^[20]. FtsZ基因是几种fts(Filamentous temperature-sensitive)蛋白中的一种, 在细胞分裂当中起关键作用, 它是定位在原核细胞叶绿体当中的, 但后来在拟南芥核基因组中发现了相同序列^[21], 不但说明其起源于叶绿体基因组, 而且也证实了基因从叶绿体当中向核基因组的转移.

叶绿体基因除了向核基因组转移外, 还可以向线粒体中转移, 但似乎这种转移仅在高等植物中出现, 而在苔藓、绿藻和红藻中没有发现. 转移到线粒体中的基因往往变成没有功能的假基因, 只有在极少数情况下会整合到线粒体基因组中并发挥作用, 例如玉米(*Zea mays*)中的trnM基因就从叶绿体中插入到线粒体基因组中并大量表达^[7].

尽管知道基因转移在高等植物中经常发生, 但对其究竟如何转移, 又如何整合到核基因组中的内在机理却知之甚少, 仅知道染色体断裂、DNA的修复功能在其中起一定作用^[22].

3 研究方法

1909年, Correns和Baur分别独立地从紫茉莉(*Mirabilis jalapa*)和马蹄纹天竺葵(*Pelargonium zonale*)的叶色遗传中发现非孟德尔现象, 之后在光学显微镜下发现叶绿体中存在DNA, 在电子显微镜下看到了DNA纤丝, 并发现有从单体到四体等多种存在形式^[7].

利用叶绿体基因组研究不同物种之间的关系主要有3种方法^[23]. 第一种是酶切. 1998年以前此方法广泛应用. 通过酶切片段大小的比较了解不同物种叶绿体基因组序列之间的变化. 1979年Scowcroft^[24]以9种不同群体的烟草为材料, 仅用EcoR I一种酶切, 发现了酶切图谱的变化并据此得到一个简单的关系图. 1980年, Vedel等^[25]利用4种麦类作物为材料, 4种酶切, 研究叶绿体和线粒体之间的进化关系, 发现叶绿体基因组酶切的多态性要远小于线粒体基因组. 1982年Palmer等^[12]用12个番茄属(*Lycopersicon*)品种和3个近缘茄科(*Solanaceae*)品种作为材料进行分析, 在25种内切酶酶切后的凝胶电泳图谱中, 调查的484个酶切位点中仅检测到39个位点的突变. 第二种方法是研究结构重组. 利用分子杂交和PCR的方法对大量的叶绿体基因组发生重组的位点附近进行比较, 检测结构的变化如基因、内含子的倒位丢失、IR区域的膨胀与收缩等. 菊科中许多原来互相矛盾的关系通过此方法得到了理顺和纠正^[26]. 第三种方法是测序. 1986年烟草^[1]和地钱^[2]叶绿体基因组序列的发表使人们第一次有机会从碱基水平上对不同基因组之间进行比较, 在研究方法上有了实质性的突破. 第一种方法由于分析的局限性而逐步淘汰, 后二种方法还将继续应用. 在DNA序列的差异非常多的时候, 用分析结构的方法尤为重要, 遗憾的是这种可以被利用的结构差异比较少^[23].

不同物种之间基因组的比较和重复分析可以提供丰富的信息. 首先, 可以用Dogma程序来进行基因鉴定, 然后利用如MultiPipmaker等多种软件工具来比较基因组序列. 通过比较, 可以了解基因组成、基因顺序、序列的相似性、重复序列等一系列信息. 重复序列是叶绿体基因组序列中重要的组成部分, 根据重复序列的特征可以将不同物种的基因组进行分组并详细分析, 此工作可以利用软件工具如REPuter未完成.

4 重要作物叶绿体基因组的研究及其进化关系比较

在目前已经得到的82组不同物种叶绿体基因组的序列中, 被子植物共占46组, 其中双子叶植物37组和单子叶植物9组, 裸子植物3组, 其他包括苔藓类、藻类等低等原生物共33组. 基因数量最多的是条斑紫菜, 为264个; 最少的一种寄生性绿藻(*Helicosporidium* sp.ex *Simulium jonesii*), 为54个. 科学家在新喀里多尼亚岛(New Caledonia)上发现一种常绿灌木(*Amborella trichopoda*), 被认为是最古老被子植物唯一现存的代表, 可能代表裸子植物和被子植物之间分化刚开始时关键的中间状态, 其叶绿体序列已公布, 共有133个基因, 其中编码蛋白质的基因有86个^[27].

重要作物叶绿体基因组的研究非常重要. 目前, 许多作物如水稻、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米、大豆(*Glycine max*)等的叶绿体基因组序列已测定^[27]. 同时, 新的序列不断出现, 本研究小组关于大麦(*Hordeum vulgare*)、高粱(*Sorghum bicolor*)和草坪草(*Agrostis stolonifera*)叶绿体基因组序列的研究论文前不久刚发表^[28]. 这几种作物叶绿体基因组序列的特征上, 其A+T含量基本一致, 水稻为61.1%, 小麦为61.7%, 玉米为61.5%, 大麦为61.9%, 高粱为61.5%, 草坪草为61.55%. 大豆叶绿体基因组的序列特征和其他被子植物差别较大, A+T含量比较高, 为66%, 而且在LSC区域的rbcL基因和rps16基因之间有一个约51kb的序列倒置片段^[8], 这个现象在其他豆科植物如百脉根(*Lotus japonicus*)和苜蓿也同样存在. 通过比较水稻、小麦和玉米的叶绿体基因组, 发现了一些容易产生突变的热点区域, 而且串联的tRNA区域和其下游的rbcL表现出种属特异性, IR区域里面开放阅读框的删除方式和IR与SSR的边界特征表明, 水稻和小麦之间的亲缘关系比玉米更密切^[28]. 一般的研究只用一个叶绿体基因组的基因研究禾本科的进化关系, 很难明确其关系, 而Matsuoka等用106个基因进行研究, 用烟草作为参照, 通过对水稻、小麦和玉米叶绿体基因组的比较, 发现86.8%的基因进化速率一致, 相对其他基因, RNA基因的进化高度保守, 同时也得出明确结论, 支持水稻(竹亚科)和小麦(早熟禾亚科)之间的关系更加紧密的论点, 说明玉米(黍亚科)在草本植物进化的早期就和水稻、小麦开始分化了.

Wolfe等利用叶绿体基因组的DNA序列分析结果估计, 单子叶和双子叶植物最初分化发生在约2亿年前, 而分析细胞核中编码rRNA大小亚基的基因序列得到了相似的结论^[10].

2004年, 通过比较野生稻与栽培稻的叶绿体基因组, 揭示了二者之间的差别, 野生稻整个叶绿体基因组有57个插入, 61个删除和159个碱基的置换. 在置换当中, 颠换(transversion)的频率要比转换(transition)的频率高得多. 插入和删除多发生在IR区域的编码区, 而此区域则很少发生置换^[3]. Tang等^[9]通过比较典型籼稻和粳稻的叶绿体基因组序列, 认为二者叶绿体基因组的分化时间大约发生在8.6万年到20万年前之间.

玉米叶绿体基因组序列的研究表明, 在IR区域内, 编码蛋白质基因的核酸替换比率显著减少, 预示着IR区域的存在可能会增加这个区间内基因的遗传稳定性^[7,10].

5 叶绿体遗传转化的方法和进展

叶绿体基因组有大量的拷贝数, 每个基因在植物叶绿体中的拷贝数可达1万个, 而在IR区域的基因则加倍, 表达的目的蛋白占可溶性蛋白的比例可以高达46.1%^[6,29], 所以它非常适合遗传转化. 首次叶绿体转化成功的是一种单细胞的绿藻(*Chlamydomonas reinhardtii*), 此后, 烟草的叶绿体

转化体系得以建立并成为迄今为止应用最广泛的模式植物. 到目前为止, 在烟草上表达的基因数量比其他植物中表达基因的总和还多, 而且作为生物反应器, 其生产成本不到大肠杆菌发酵系统生产成本的2%^[6,29]. 由于烟草既不属于食物也不是饲料, 所以如果在它开花之前收获叶子, 加上属于母性遗传, 几乎可以完全杜绝基因污染的问题^[30]. 最近在美国国家科学院学报(PNAS)上发表的2篇文章也证明了这一点^[31,32].

作为转基因研究的新手段, 叶绿体转化技术迅速发展. 此技术有几个基本步骤, 包括选择合适的外植体、选择载体插入位点、载体构建、基因枪转化(也可采用PEG方法)、筛选、再生及转化后代的鉴定与分析. 图2简要显示了该技术的几个关键步骤^[29]. 由于该技术是靠定点插入方式使外源基因整合到叶绿体基因组内, 所以选择插入位点很重要. 在载体构建过程中, 可以插入一个或多个目的基因. 筛选基因可以用抗生素, 也可以用非抗生素如甜菜碱醛等, 筛选后再再生, 最后得到转化植株. 图2下方以植物二倍体细胞为例, 直观地说明了筛选后可能出现杂合及纯合的转化后代. 为了得到期望的纯合后代, 优化选择压力和进行2次筛选都是必要的. 得到转化植株后, 可以用PCR和DNA杂交等方法进行鉴定.

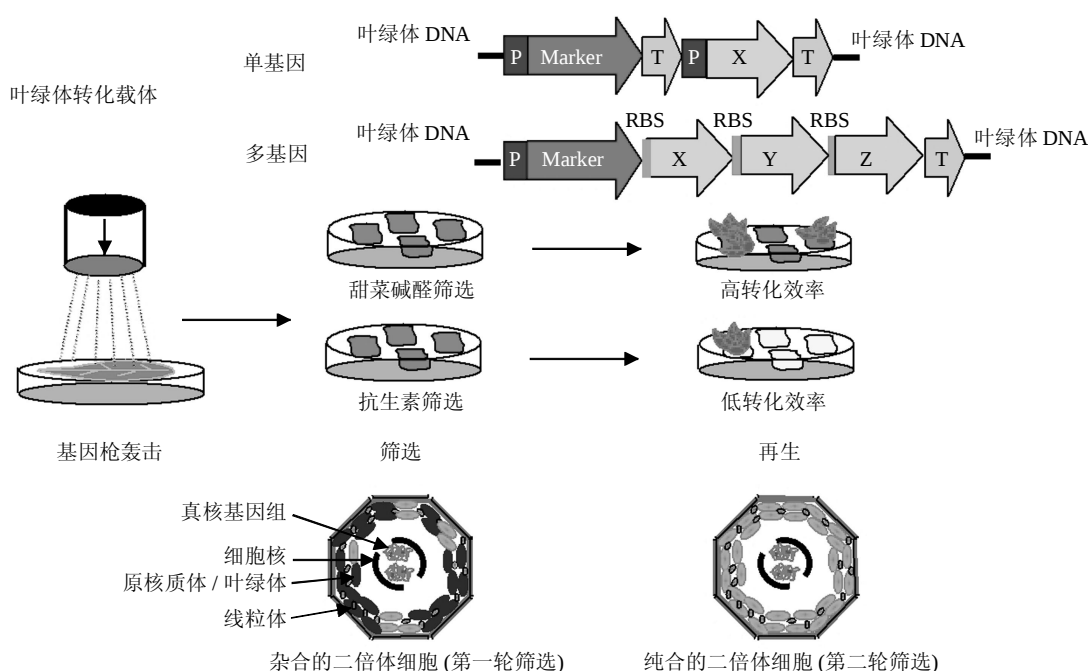


Fig. 2 Schematic drawing of chloroplast transformation ^[29]

图2 叶绿体转化方法示意图 ^[29]

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”在土豆和番茄上虽然也成功了, 但是转化效率非常低, 主要是同源序列的问题, 因为在叶绿体转化体系中, 重组序列完全相同才能获得理想的转化效率. 实际上, 叶绿体序列未知也是限制重要农作物利用这个技术的重要原因, 尽管有200种非作物的叶绿体序列已知或者正在测序中, 但目前已知的农作物序列还很有限^[10,23]. 和许多转化成功的双子叶植物相比, 单子叶植物的转化比较困难, 需要了解更多的关于体细胞胚胎发生、筛选条件、影响同质化的因素等信息, 但最近, 在水稻的叶绿体转化方面有了突破, 尽管没有得到完全同质化的转化材料, 但外源基因能够表达并可以传递给后代^[33].

关于叶绿体转化的优势, 前面已经叙述, 但值得强调的是其在生物安全方面的巨大优越性. 传统的核转化材料, 通过花粉漂移可能存在潜在风险. 叶绿体转化是母性遗传, 理论上不可能通过花粉传播, 但一直缺乏系统的实验证明, 最新的研究给这个观点提供了有力的支持. Ruf等^[32]研究表明, 用叶绿体转化材料为父本提供花粉, 用雄性不育系作为母本, 理论上杂交后代不应该含有父本叶绿体的基因, 但是通过后代大量筛选, 发现有极低水平的父本基因泄露, 其中基因进入到F1后代子叶中的频率是 1.58×10^{-5} , 而进入到顶端分生组织的频率是 2.86×10^{-6} . 另外一个实验也是用烟草, 发现通过父本传递的频率是 9×10^{-5} , 而且发现叶绿体基因组通过花粉管传递的是整个基因组, 而不是片段, 更重要的是线粒体中的基因也可以通过花粉管传递到后代中^[30,31].

通过这2个研究, 我们知道, 叶绿体转化不是绝对的安全, 但因为外源基因通过叶绿体转化体系漂移的频率极低, 我们没有必要担心其可能造成的污染. 近期欧盟公布的非转基因产品中, 含0.9%或低于这个标准的转基因产品污染不用标记就可以上市. 按照这个标准, 叶绿体转化中父本的泄露机会要低很多个数量级, 况且在田间条件下, 没有了选择压力, 叶绿体转化通过花粉漂移污染的机会将更低^[30~32].

在叶绿体中表达某些产物具有核表达没有的优势, 例如霍乱毒素B亚基可以作为疫苗抗原和黏膜载体来输送蛋白质, 核转基因植株表达后, 生长受到严重抑制, 但叶绿体转化的植株, 尽管表达量高出500~4000倍, 但表现型不见任何异常^[34].

到目前为止, 利用叶绿体转化技术已经取得了重大进展, 在农艺性状(抗病虫、抗盐耐旱、抗除草剂、雄性不育等), 生物制剂(生长素、干扰素、血清蛋白、胰岛素等), 疫苗生产(霍乱、狂犬病、炭疽病、破伤风、阿米巴等)等方面都有了成功的经验. 转化的植物种类除了常用的烟草外, 扩大到了棉花、胡萝卜、生菜、番茄、土豆等多种植物. 关于这方面的进展, 最近有详细的综述^[6,34].

6 存在问题和未来展望

虽然叶绿体基因组的序列以快速增长的方式出现, 但是考虑到其庞大的数量, 目前数据库中只是其中很小的一部分, 有待于今后更多的信息公布. 更重要的是, 和生产息息相关的主要农作物的叶绿体基因组信息还很有限, 需要进一步加强. 确认叶绿体基因组中合适的重组整合位点, 克服主要农作物叶绿体转化进展缓慢的矛盾^[6], 是目前亟待需要解决的关键问题.

作为生物改良的有效手段, 叶绿体遗传转化为今后的作物产量、抗性、品质改良、生物反应器、生物制药等众多领域开创了新机会, 尤其是在生物安全方面的优势, 将很快成为今后生物技术领域的主导力量. 尽管最新的研究表明, 外源基因可以通过花粉途径“泄露”出来, 但极低的几率可以使污染的风险从根本上得到解决, 消除公众的心理影响. 另外, 利用叶绿体转化的高效率表达, 可以极大地降低疫苗和生物制剂的生产成本, 可以让大多数人都有机会享受最新的科技成果. 例如, 用烟草叶绿体转化生产炭疽病疫苗, 一英亩转化烟草可收获40公吨的叶片, 即使在纯化过程中损失50%, 仍可得到3.6亿单位的剂量, 而且具有完全活性^[34].

作为光合作用的中心, 叶绿体基因组的研究对揭示植物光合作用的机制和代谢调控具有重要意义, 同时, 叶绿体中的大量蛋白质来自于细胞核基因组, 它本身只是一个半自主的细胞器, 对叶绿体基因组的深入研究有助于理解细胞核基因组与叶绿体基因组之间的相互调节作用. 利用不同物种光系统之间的差别, 通过转化提高作物的光能吸收和转化效率, 进一步提高作物产量, 这些领域都为叶绿体基因组研究创造了更大的拓展空间.

参考文献

- 1 Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, et al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome its gene organization and expression. EMBO J, 1986, 5(9): 2043~2049

- 2 Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, et al. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of Liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature*, 1986, 322(6079): 572~574
- 3 Shahid M M, Nishikawa T, Fukuoka S, et al. The complete nucleotide sequence of wild rice (*Oryza nivara*) chloroplast genome: first genome wide comparative sequence analysis of wild and cultivated rice. *Gene*, 2004, 340(1): 133~139
- 4 Hiratsuka J, Shimada H, Whittier R, et al. 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*, 1989, 217(2~3):185~194
- 5 Tang J, Xia H, Cao M, et al. A comparison of rice chloroplast genomes. *Plant Physiol*, 2004, 135(1): 412~420
- 6 Grevich J J, Daniell H. Chloroplast genetic engineering: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2005, 24: 83~107
- 7 Maier R M, Schmitz-Linneweber C. Plastid genomes. In: Daniell H, Chase C D, eds. *Molecular Biology and Biotechnology of The Plant Organelles: Chloroplasts and Mitochondria*. Netherlands: Kluwer Academic publisher, 2004. 115~150
- 8 Saski C, Lee S B, Daniell H, et al. Complete chloroplast genome sequence of *Glycine max* and comparative analysis with other legume genomes. *Plant Mol Biol*, 2005, 59(2): 309~322
- 9 Simpson C L, Stern D B. The treasure trove of algal chloroplast genomes. Surprises in architecture and gene content, and their functional implications. *Plant Physiol*, 2002, 129(3): 957~966
- 10 Raubeson L A, Jansen R K. Chloroplast genomes of plants. In: Henry R J ed. *Plant Diversity and Evolution: Genotypic and Phenotypic Variation in Higher Plants*. UK: CABI publishing, 2005. 45~68
- 11 McFadden G I. Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *J Phycol*, 2001, 37(6): 951~959
- 12 Palmer J D, Zamir D. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(16): 5006~5010
- 13 Bock R. Extranuclear inheritance: Gene transfer out of plastids. *Prog Bot*, 2005, 67: 75~98
- 14 Stegemann S, Bock R. Experimental reconstruction of functional gene transfer from the tobacco plasmid genome to the nucleus. *Plant Cell*, 2006, 18 (11): 2869~2878
- 15 Matsuo M, Ito Y, Yamauchi R, et al. The rice nuclear genome continuously integrates, shuffles, and eliminates the chloroplast genome to cause chloroplast-nuclear DNA flux. *Plant Cell*, 2005, 17(3): 665~675
- 16 Martin W, Rujan T, Richly E, et al. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(19): 12246~12251
- 17 Millen R S, Olmstead R G, Adams K L, et al. Many parallel losses of *infA* from chloroplast DNA during angiosperm evolution with multiple independent transfers to the nucleus. *Plant cell*, 2001, 13(3): 645~658
- 18 Gantt J S, Baldauf S L, Calie P J, et al. Transfer of *rpl22* to the nucleus greatly preceded its loss from the chloroplast and involved the gain of an intron. *EMBO*, 1991, 10(10): 3073~3078
- 19 Sugiura C, Kobayashi Y, Aoki S, et al. Complete chloroplast DNA sequence of the moss *Physcomitrella patens*: evidence for the loss and relocation of *rpoA* from the chloroplast to the nucleus. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(18): 5324~5331
- 20 Bubunenko M G, Schmidt J, Subramanian A R. Protein substitution in chloroplast ribosome evolution: A eukaryotic cytosolic protein has replaced its organelle homologue (L23) in spinach. *J Mol Biol*, 1994, 240(1): 28~41
- 21 Osteryoung K W, Vierling E. Conserved cell and organelle division. *Nature*, 1995, 376(6540): 473~474
- 22 Pichersky E, Logsdon J M Jr, McGrath J M, et al. Fragments of plastid DNA in the nuclear genome of tomato: prevalence, chromosomal location, and possible mechanism of integration. *Mol Gen Genet*, 1991, 225(3): 453~458
- 23 Jansen R K, Raubeson L A, Boore J L, et al. Methods for obtaining and analyzing chloroplast genome sequences. *Methods Enzymol*, 2005, 395: 348~384
- 24 Scowcroft W R. Nucleotide polymorphism in chloroplast DNA of *Nicotiana debneyi*. *Theor Appl Genet*, 1979, 55(3~4): 133~137
- 25 Vedel F, Lebacqz P, Quetier F. Cytoplasmic DNA variation and relationships in cereal genomes. *Theor Appl Genet*, 1980, 58(5): 219~224
- 26 Jansen R K, Palmer J D. Chloroplast DNA from lettuce and *Barnadesia* (Asteraceae): Structure, gene localization, and characterization of a large inversion. *Curre Genet*, 1987, 84: 5818~5822
- 27 Cui L, Veeraraghavan N, Richter A, et al. ChloroplastDB: the Chloroplast Genome Database. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34 (Database issue): D692~D696
- 28 Saski C, Lee S B, Fjellheim S, et al. Complete chloroplast genome sequences of *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* and *Agrostis stolonifera*, and comparative analyses with other grass genomes. *Theor Appl Genet*, doi:10.1007/s00122-0567-4
- 29 Daniell H, Khan M S, Allison L. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Science*, 2002, 7: 84~91
- 30 Daniell H. Transgene containment by maternal inheritance: Effective or elusive? *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(17): 6879~6880
- 31 Svab Z, Maliga P. Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(17): 7003~7008
- 32 Ruf S, Karcher D, Bock R. Determining the transgene containment level provided by chloroplast transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(17): 6998~7002
- 33 Lee S M, Kang K, Chung H, et al. Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. *Molecules and Cells*, 2006, 21(3): 401~410
- 34 Daniell H. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnology Journal*, 2006, 1: 1071~1079

Progress in Chloroplast Genome Analysis*

XING Shao-Chen¹⁾, CLARKE JIHONG LIU^{2)**}

¹⁾Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, 130124, China;

²⁾Department of Genetics and Biotechnology, Plant Health & Protection Division,
Norwegian Institute for Agricultural & Environmental Research, N-1432 Ås, Norway)

Abstract Being organelles present in higher plants and algae, and containing the entire machinery for the process of photosynthesis and their own genetic system, chloroplasts have played important roles in plant evolution. With the help of molecular approaches, the structure and sequences of chloroplast genomes have been studied to a large extent. The valuable chloroplast genomic information has been utilized in investigating plant evolution, diversity and phylogenetic relationships between different species. At the same time, chloroplast genome sequences are the essential information paving the road for successful chloroplast genetic engineering, which has shown considerable advantages compared with nuclear transformation and demonstrated its great potential in genetic improvement and the production of biopharmaceuticals. The latest developments in chloroplast genome analysis are reviewed, providing readers with insight into the fast growing field and facilitating a comprehensive understanding of the evolution, genetics and phylogenetic relationships among plants. It is also hoped to promote the further development of chloroplast technology and the commercial application of chloroplast transformation.

Key words chloroplast genome, origin, evolution, transformation, progress

* This work was supported by a grant from The National Plant Transformation and Commercialization Program (J00-B-003).

** Corresponding author. Tel:86-47-92609264, E-mail: jihong.liu-clarke@bioforsk.no

Received: May 28, 2007 Accepted: July 2, 2007