

انتقال ژن به پلاستید در گیاهان: مرور کامل بر مکانیسم و

پیشرفت‌های حاصل و محدودیت‌های موجود

محمد احمدآبادی^{۱*}

۱- استادیار گروه کشاورزی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم آذربایجان،

تبریز، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ahmadabadiir@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۱ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۳۰)

چکیده

تکنیک‌های انتقال ژن به گیاهان از اهمیت ویژه‌ای در تحقیقات پایه و کاربردی برخوردار می‌باشند. چندین سال پیش، انتقال ژن تنها به ژنوم هسته امکانپذیر بود. در سال‌های اخیر، بدلیل مزایای قابل توجه، یک ژنوم دیگر از ژنوم‌های سه گانه گیاهان، یعنی DNA حلقوی پلاستیدها (ارگانل‌های نیمه مستقلی که منشاء پروکاریوتی دارند)، برای انتقال ژن‌های خارجی تحت توجه فوق العاده‌ای قرار گرفت. به طوری که پس از اولین موفقیت در زمینه انتقال ژن به پلاستید در توتون توسط مالیگا و همکاران، تلاش‌های بسیار زیادی برای توسعه این تکنیک بی‌نظیر در گیاهان انجام گرفت. با وجود اینکه تعدادی از این فعالیت‌ها کم و بیش به نتیجه خوبی منجر شده‌اند، ولی تا به حال این روش تنها در توتون بازده قابل قبول داشته و توسعه این تکنیک به گیاهان مهم زراعی از قبیل ذرت با مشکلات عدیده‌ای مواجه بوده است. در این مقاله علاوه بر معرفی این تکنیک و اساس مولکولی آن و پیشرفت‌هایی که تا کنون در زمینه توسعه این تکنیک انجام شده، محدودیت‌ها و مشکلات موجود در زمینه توسعه فناوری انتقال ژن به پلاستید در گیاهان مهم زراعی بحث می‌شود.

واژه‌های کلیدی

انتقال ژن،
پلاستید،
DNA

مقدمه

پلاستیدها ارگانل‌های نیمه مستقل گیاهی می‌باشند که نه تنها مسئول انجام فتوسنتز هستند، بلکه در سایر فعالیت‌های حیاتی از قبیل تولید اسیدهای آمینه، هورمون و لیپید و همچنین جذب نیترات و سولفات نقش ایفا می‌کنند [۱-۳]. پلاستیدها در یک واقعه اندوسمبیوتیک^۱ بین سیانوباکتری^۲ فتوسنتز کننده و یک یوکاریوت اولیه^۳ که میتوکندری در آن ایجاد شده بود [۴،۵]، وارد سلول یوکاریوت شده‌اند. در طول انتقال تدریجی باکتری به داخل سلول میزبان، اندازه ژنوم ارگانل به میزان قابل توجهی از طریق حذف توده‌های ژن‌ها و یا انتقال آنها به ژنوم هسته میزبان کاهش یافته است [۶]. بدین دلیل در ارگانل‌های امروزی، اندازه ژنوم بسیار کوچک می‌باشد. تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که انتقال ژن از پلاستید به هسته، پدیده‌ای است که هم اکنون نیز با سرعت نسبتاً بالایی صورت می‌گیرد [۴]. پروکلروفیت‌ها^۴، از قبیل پروکلروکوکوس^۵، زمانی بعنوان نزدیکترین خویشاوند اجداد پلاستیدها معرفی می‌شدند، اما کشفیات اخیر، روی این فرضیه سایه شک افکنده و لذا هنوز گروه دقیق باکتری‌ها که منشأ پلاستیدها می‌باشند، ناشناخته مانده است [۷].

ژنوم پلاستید گیاهان عالی از یک مولکول DNA دورشته حلقوی تشکیل شده که اندازه آن حدود ۱۶۰-۱۲۰ kb می‌باشد (شکل ۱). تعداد قابل توجهی از نسخه‌های ژنوم پلاستید در تمام انواع آن، از قبیل کلروپلاست‌های سبز، آمیلوپلاست‌های ذخیره کننده نشاسته، لوکوپلاست‌ها^۶ی تولید کننده چربی و کروموپلاست‌های ذخیره کننده کارتنوئیدها، وجود دارد، که بطور کلی حدود ۲۰-۱۰ درصد کل محتوای DNA سلولی را تشکیل می‌دهد [۸،۹]. چندین خصوصیت باکتریایی از قبیل مکانیسم پروکاریوتی بیان ژن و سیستم نوترکیبی توالی‌های همولوگ^۷ در پلاستیدها از والدین آنها به ارث رسیده‌اند [۸]. با وجود اینکه

سازماندهی ژن‌ها در اپرون^۸ها یکی از خصوصیات پروکاریوتی می‌باشد که در پلاستیدها حفظ شده، ولی رونش‌های اپرون‌های پلاستیدها بر خلاف باکتری‌ها، بصورت وسیع فراوری شده و گونه‌های مختلف RNA که اکثراً بصورت مونوسیسترونیک^۹ می‌باشند، ایجاد می‌کنند [۱۰]. در اکثر موارد، قطعه قطعه شدن مولکول RNA به همراه ویرایش^{۱۰} آن، در فرایند تولید RNA بالغ دخالت دارند [۱۱،۱۲].

اکثر ژن‌های کلروپلاست بوسیله‌ی RNA پلیمرازی که توسط ژنوم پلاستید ساخته می‌شود (PEP^{۱۱})، و واحدهای تشکیل دهنده‌ی آن شبیه زیرواحدهای RNA پلیمراز *E. coli* می‌باشد، رونویسی می‌شوند. پروموتورهایی که توسط این آنزیم شناسایی می‌شوند، شبیه پروموتورهای سیگمای *E. coli* و حاوی نواحی شناسایی ۳۵- و ۱۰- هستند [۱۳]. انتخاب پروموتر توسط PEP، به وجود فاکتورهای شبه δ که از طریق هسته کد می‌شوند، بستگی دارد. علاوه بر آن، فعالیت برخی از پروموتورها بوسیله‌ی فاکتورهای تنظیم کننده‌ی رونویسی که در هسته ساخته می‌شوند، تنظیم می‌شود [۱۴]. این عوامل، باعث تنظیم بیان ژن‌های پلاستید توسط هسته در پاسخ به محرک‌های محیطی و رشد و نمو، می‌شوند. همچنین، وجود یک RNA پلیمراز دیگر که از طریق هسته ساخته شده (NEP^{۱۲}) و در بیان ژن‌های پلاستیدها دخالت دارد، به اثبات رسیده است [۱۵]. اکثر ژن‌ها و اپرون‌های پلاستید حداقل یک پروموتر برای NEP و PEP دارند [۱۵]. با این حال، یک دسته از ژن‌های پلاستید، شامل ژن‌های فتوسیستم I و II، تنها از طریق پروموتورهای PEP رونویسی می‌شوند. همچنین، برخی از ژن‌های پلاستید، از قبیل *accD*، تنها بوسیله‌ی NEP رونویسی می‌شوند. ده نوکلئوتید در توالی پروموتورهای NEP شناسایی شده‌اند که برای فعالیت آنزیم NEP ضروری می‌باشند [۱۵]. در اکثر آزمایشات، از پروموتر کد کننده‌ی RNA ریپوزومی 16S (Prn)، که حاوی هر دو توالی تشخیص برای NEP و PEP می‌-

¹ Endosymbiotic event² Cyanobacterium³ Proto-eukaryote⁴ Prochlorophyte⁵ Prochlorococcus⁶ Leucoplast⁷ Homologous recombination (HR)⁸ Operon⁹ Monocistronic¹⁰ Editing¹¹ Plastid-Encoded RNA Polymerase¹² Nuclear-Encoded RNA Polymerase

تنظیم کننده رونویسی و بیان ژن، توسط هرچ^{۱۳} و همکاران مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند که خواننده برای مطالعه‌ی بیشتر به این منبع ارجاع داده می‌شود [۱۹].

باشد، جهت بیان پروتئین‌های نوترکیب در پلاستیدها استفاده می‌شود [۹، ۱۶-۱۸]. پروموتور ژن *psbA* (PpsbA)، یکی دیگر از پروموتورهای قوی است که برای بیان پروتئین‌های نوترکیب در کلروپلاست‌ها بکار می‌رود. تعدادی از پروموتورها و توالی‌های

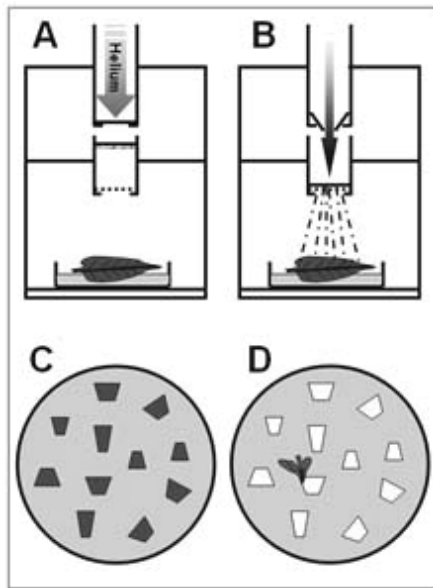


شکل ۱- سازماندهی ژن‌های پلاستید در گیاه ذرت (*Zea mays* L.). دو توالی تکراری معکوس (IR_A و IR_B), قسمت باقیمانده ژنوم را به دو بخش توالی غیرتکراری کوچک (SSC)^{۱۴} و بزرگ (LSC)^{۱۵} تقسیم می‌کنند [۲۵]. ژن‌های داخل حلقه در جهت عقربه‌های ساعت رونوشت برداری می‌شوند. این نقشه، توسط نویسنده مقاله، با استفاده از برنامه “*OrganelleGenomeDRAW*” [۲۶] رسم گردیده است.

¹³ Herz

¹⁴ Small single copy

¹⁵ Large single copy



شکل ۲- روش تفنگ ژنی که در اکثر آزمایشات انتقال ژن به پلاستید، استفاده می‌شود. (A) دستگاه تفنگ ژنی که آماده شلیک ذرات ریز طلا که با پلاسمید ویژه انتقال ژن به پلاستید پوشانیده شده‌اند، می‌باشد. (B) پس از شلیک، ذرات طلا با سرعت بالا به قطعات برگ برخورد کرده و با نفوذ از دیواره و غشای سلولی و احتمالاً با ایجاد خراش‌هایی در غشای دو لایه پلاستیدها، موجب انتقال پلاسمید به داخل کلروپلاست‌ها می‌شوند. (C) پس از انجام عمل شلیک، برگ‌ها به قطعات چند میلی متری تقسیم شده و روی محیط باززایی که حاوی آنتی بیوتیک مناسب می‌باشد، کشت می‌شوند. (D) پس از گذشت چندین هفته، باززایی گیاهان مقاوم به آنتی بیوتیک انجام می‌گیرد. این گیاهان در مرحله هتروپلاسمی (دارای مخلوطی از ژنوم وحشی و تراریخت) می‌باشند و برای رسیدن به مرحله هموپلاسمی پایدار، باید چندین دور متوالی از باززایی گیاه را در حضور آنتی بیوتیک بگذرانند تا با انجام تعداد کافی از تقسیم سلولی، ژنوم تراریخت نیز تکثیر شده و همزمان با آن ژنوم وحشی نیز بخاطر وجود آنتی بیوتیک حذف گردد.

اساس مولکولی فرایند انتقال ژن به کلروپلاست انتقال ژن به پلاستیدها شامل انتقال دقیق یک قطعه خارجی DNA به داخل ژنوم پلاستید (پلاستوم^{۱۸}) از طریق نوترکیبی توالی‌های همولوگ می‌باشد (شکل ۳). این توانایی نوترکیبی خصوصی

علاوه بر مراحل رونوشت برداری و بلوغ RNA، بیان ژن‌های پلاستید به طور معنی‌داری در مرحله ترجمه و فراوری پلی پپتید کنترل می‌شود [۲۰، ۲۱]. ماشین ترجمه در پلاستیدها دارای چندین خصوصیت باکتریایی، از قبیل ریبوزومهای ۷۰S و tRNA های آغازگر فرمیل‌دار می‌باشند. همچنین، در برخی از ژن‌های پلاستید، توالی معروف به شاین-دالگارنو^{۱۶} که برای ترجمه ژن‌های باکتری‌ها ضروری می‌باشند، گزارش شده است [۲۲]. آزمایشات نشان می‌دهند که پس از پایان عمل ترجمه، کلروپلاست‌ها قادر به ایجاد ساختار نهایی مطلوب برای فعالیت پروتئین‌های نوترکیب در بدن انسان، می‌باشند [۲۳]. در واقع، کلروپلاست‌ها بهترین اجزای سلول برای تولید آنزیم‌های پیچیده یوکاریوتی هستند. بطوریکه، پس از ساخته شدن رشته پلی پپتید، پیوندهای دی-سولفیدی، بدون وقوع گلیکوزیلاسیون^{۱۷}، در محل‌های مناسب تشکیل شده و ساختار نهایی پروتئین را ایجاد می‌کند. برای مثال، می‌توان به سوماتوتروپین انسانی (hST) اشاره کرد. بیان این پروتئین در کلروپلاست گیاه توتون، منجر به تولید ۳۰۰ برابر سوماتوتروپین بیشتر نسبت به بیان همین ژن در هسته شد [۲۴]. علاوه بر آن، hST بدست آمده از کلروپلاست، از نظر بیولوژیکی نیز فعال بود.

سیستم‌های انتقال ژن به پلاستیدها

بمباران برگ‌ها یا کشت‌های سوسپانسیون سلولی با استفاده از تفنگ ژنی [۲۷-۳۰] (شکل ۲) و تیمار پروتوپلاست‌ها با پلی اتیلن گلیکول [۳۱، ۳۲]، دو روشی هستند که بطور موفقیت آمیز برای انتقال قطعات DNA خارجی به پلاستید گیاهان استفاده شده‌اند. با این وجود در اکثر آزمایشات انتقال ژن به پلاستید، روش تفنگ ژنی مورد استفاده قرار می‌گیرد که بازده بالاتری دارد. همچنین، استفاده از روش ریزتزریقی نیز برای انتقال ژن‌های خارجی به کلروپلاست‌ها گزارش گردیده است [۳۳]. با این حال، استفاده از این روش بدلیل پرزحمت بودن و بازده بسیار پایین آن منسوخ گردیده است.

^{۱۶} Shine-Dalgarno

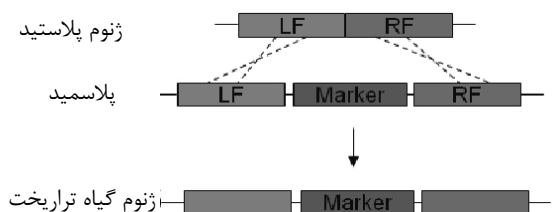
^{۱۷} Glycosylation

^{۱۸} Plastome

اگرچه تعدادی از مناطق بین‌ژنی برای انتقال ژن‌های خارجی گزارش شده‌اند، ولی ۳ ناحیه بیش از همه مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۹]. دو مورد از این نواحی، شامل فواصل بین‌ژنی *trnI-trnA* و *trnV-3'rps12* در ناحیه‌ی تکراری ژنوم پلاستید، و ناحیه‌ی *trnM-trnG* در قسمت غیرتکراری بزرگ قرار دارند. با توجه به اینکه این نواحی در گیاهان مختلف تنوع نشان می‌دهند، بنابراین، برای انجام آزمایشات انتقال ژن در گیاهان، وکتورهای اختصاصی برای هر گیاه طراحی می‌شود. با این حال، اگر تفاوت توالی ژنوم‌ها زیاد نباشد، می‌توان از وکتور مشترک نیز استفاده کرد. مثلاً، رووف^{۲۰} و همکاران، از وکتور اختصاصی توتون برای انتقال ژن به گوجه‌فرنگی استفاده کردند [۲۹]. با این وجود، جایگزینی توالی‌های ژنوم توتون در وکتور، با توالی‌های ژنوم گوجه‌فرنگی، باعث افزایش کارایی انتقال ژن به پلاستید گیاه گوجه‌فرنگی شد [۳۴]. بنابراین، در اکثر آزمایشات انتقال ژن به پلاستید، استفاده از وکتورهای اختصاصی، پیشنهاد می‌گردد.

ژنوم پلاستید سطح پلوئیدی بسیار بالایی دارد [۳۵] و هر پلاستید می‌تواند بین ۱۰ الی ۱۰۰ نسخه از ژنوم پلاستید را داشته باشد. تعداد پلاستیدها در هر سلول نیز بسیار متغیر است [۲۵] و یک سلول مزوفیل برگ که برای عمل فتوسنتز تمایز یافته است، می‌تواند ده‌ها تا صدها کلروپلاست داشته باشد. بنابراین، یک سلول مزوفیل برگ می‌تواند حدود ۱۰۰۰۰ نسخه از ژنوم پلاستید را داشته باشد. بدین دلیل، گیاه تراریخت اولیه که اصطلاحاً "ترانس-پلاستومیک نامیده می‌شود، دارای مخلوطی از ژنوم اولیه (وحشی) و تراریخت می‌باشد، که این حالت را اصطلاحاً "هتروپلاسمی"^{۲۱} می‌نامند (شکل ۴). برای انتقال پایدار ژن خارجی به پلاستید، حذف نسخه‌های وحشی از پلاستوم ضروری می‌باشد، زیرا در غیر این صورت احتمال دارد با عمل نوترکیبی بین نسخه‌های وحشی و تراریخت، قطعه DNA خارجی از ژنوم جدا شده و حذف گردد. حالتی که تمام نسخه‌های ژنوم پلاستید با هم مشابه-اند، اصطلاحاً "هوموپلاسمی"^{۲۲} نامیده می‌شود (شکل ۴). مرحله هوموپلاسمی می‌تواند با انجام چندین مرحله تقسیم سلولی

است که پلاستیدها از اجداد باکتریایی خود به ارث برده‌اند. بنابراین، در سیستم انتقال ژن به پلاستید، قطعه DNA مورد نظر را بین دو توالی DNA که مشابه (همولوگ) توالی‌هایی از ژنوم پلاستید می‌باشند، قرار می‌دهند [۸]. در نتیجه انجام دو واقعه نوترکیبی که بین دو قطعه DNA همولوگ که ژن خارجی مورد نظر را در بر می‌گیرند، و ژنوم پلاستید، DNDی خارجی بطور دقیق در محلی که از قبل پیش بینی شده، وارد می‌شود (شکل ۳).



شکل ۳- شکل شماتیک سیستم انتقال ژن خارجی به ژنوم پلاستید (پلاستوم). ژن مورد نظر (که اینجا همان Marker می‌باشد) در پلاسمید، بین دو قطعه DNA (که با LF به معنی Left Flank یا توالی در برگیرنده چپ و RF به معنی Right Flank یا توالی در برگیرنده راست نشان داده شده‌اند) که با توالی پلاستوم مشابهت دارند، قرار داده می‌شود. پس از انتقال پلاسمید به داخل پلاستید، از طریق دو واقعه نوترکیبی بین توالی‌های همولوگ (که با خطوط نقطه چین نشان داده شده‌اند)، قطعه DNA مورد نظر دقیقاً در محل بین توالی‌های همولوگ به پلاستوم وارد می‌شود. گیاه تراریخت حاصله، اصطلاحاً "ترانس-پلاستومیک"^{۱۹} خوانده می‌شود.

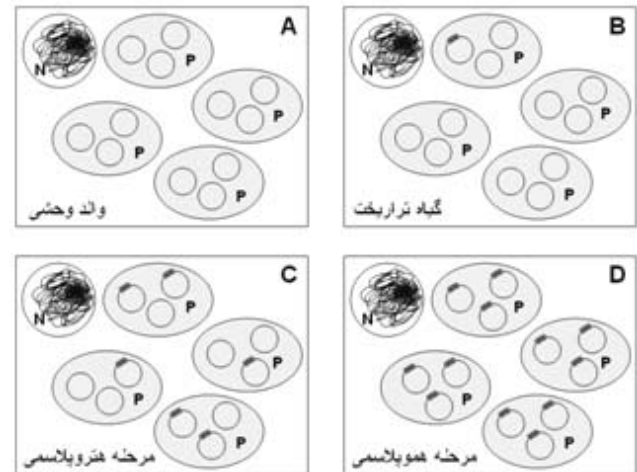
ناحیه‌ی انتقال DNA خارجی به داخل ژنوم پلاستید، و در نتیجه توالی‌های دربرگیرنده‌ی راست و چپ، بر اساس هدف مورد نظر انتخاب می‌گردد. اگر هدف، مطالعه‌ی عمل ژن با استفاده از سیستم ژنتیک معکوس باشد، ژن انتخابگر به ناحیه‌ای در داخل ژن هدف و با استفاده از توالی‌های آن بعنوان دربرگیرنده، وارد می‌شود. در حالیکه، برای بیان پروتئین‌های نوترکیب، ژن‌های کد کننده‌ی آنها به ناحیه‌ای در فاصله‌ی بین ژن‌ها وارد می‌شود.

²⁰ Ruf²¹ Heteroplsmy²² Homoplasmy¹⁹ Transplastomic

ژن‌های انتخابگر موجود برای گزینش گیاهان تراریخت در تکنیک انتقال ژن به پلاستیدها

تا به حال، سه نوع ژن انتخابگر برای آزمایشات انتقال ژن به پلاستیدها معرفی شده‌اند که شامل ژن‌های غالب مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها، ژن‌های مغلوب مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها و ژن‌های نهفته برگرداننده رشد فتو-توتروفیک^{۲۳} می‌باشند [۸]. مورد آخر که تنها در جلبک کلامیدوموناس (*Chlamydomonas reinhardtii*) بکار گرفته شده، موتانت‌های فتوستتزی را تکمیل کرده و قابلیت رشد روی محیط کشت حداقل از طریق انجام فتوستتزی نوری، را به آنها باز می‌گرداند. ژن‌های مغلوب مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها که هم برای کلامیدوموناس و هم برای توتون بکار گرفته شده‌اند، در واقع ال‌هایی از ژن‌های rRNA ریوزومی هستند که به آنتی بیوتیک غیر حساس می‌باشند. ژن‌های غالب مقاوم به آنتی بیوتیک که برای کلامیدوموناس و گیاهان عالی قابل استفاده می‌باشند، تا به حال بیشترین کاربرد را در ابداع سیستم-های انتقال ژن به پلاستید در گیاهان عالی را داشته‌اند. اولین ژن غالب مخصوص پلاستیدها که برای بالا بردن بازده انتقال ژن به پلاستید مورد استفاده قرار گرفت، ژن شیمیر *aadA* می‌باشد که منشاء باکتریایی دارد و با انتقال گروه آدنیل^{۲۵} به آنتی بیوتیک-های گروه آمینوگلیکوزیدی^{۲۶} از قبیل اسپکتینومایسین^{۲۷} و استرپتومایسین^{۲۸} آنها را به فرم غیرفعال تبدیل می‌کند [۳۶، ۳۷]. *nptII* نیز ژن غالب دیگری است که منشاء باکتریایی دارد و با اضافه کردن گروه فسفات به کانامایسین^{۲۹} (یکی دیگر از آنتی بیوتیک‌های گروه آمینوگلیکوزید) آنرا به فرم غیرفعال خود تبدیل می‌کند. کاربرد ژن *aadA* بازده بالاتری دارد و این مارکر مخصوص پلاستید می‌باشد، در حالیکه ژن *nptII* به نظر می‌رسد که دارای بازده کمتری باشد و تعداد قابل توجهی گیاه تراریخت تولید می‌کند که در آنها ژن *nptII* بجای ژنوم پلاستید، به ژنوم

در حضور آنتی بیوتیک بدست می‌آید. در توتون، برای مثال، گیاهان هموپلاسمیک پس از چندین دور متوالی باززایی تحت فشار بالای گزینش، تولید می‌شوند [۸].



شکل ۴- انتقال ژن به پلاستوم و ایجاد مرحله پایدار هموپلاسمی. (A) یک سلول مزوفیل اولیه (وحشی) که حاوی تعدادی کلروپلاست (P) و یک هسته (N) می‌باشد. هر کدام از کلروپلاست‌ها خود دارای چندین نسخه از ژنوم پلاستید می‌باشند. (B) پس از انتقال پلاسمید به داخل پلاستید در مراحل اولیه، قطعه DNA خارجی به یکی از پلاستوم‌ها (یا حداکثر چندین نسخه) انتقال پیدا می‌کند. این گیاه تراریخت، اصطلاحاً "ترانس-پلاستومیک خوانده می‌شود. (C) با انجام تقسیم سلولی در محیط حاوی آنتی بیوتیک با غلظت بالا و همانندسازی ژنوم‌های تراریخت، تعداد آنها افزایش پیدا می‌کند و بخاطر حضور آنتی بیوتیک در محیط کشت، ژنوم وحشی به تدریج کاهش پیدا می‌کند. با این وجود، ممکن است پلاستیدها مخلوطی از ژنوم‌های وحشی و تراریخت را داشته باشند، که این حالت اصطلاحاً "هتروپلاسمیک خوانده می‌شود. (D) پس از چندین دور متوالی گزینش و باززایی در حضور آنتی بیوتیک، تمامی ژنوم‌های پلاستید از نوع تراریخت خواهند شد که این حالت، اصطلاحاً "هموپلاسمی خوانده می‌شود.

²³ Photoautotrophic

²⁴ Mutant

²⁵ Adenyl

²⁶ Aminoglycoside

²⁷ Spectinomycin

²⁸ Streptomycin

²⁹ Kanamycin

ذخیره پروتئین‌هایی می‌باشند که اگر در سیتوپلاسم باشند، می‌توانند برای سلول مضر باشند [۴۰].

اهمیت انتقال ژن به پلاستید از نظر تحقیقات پایه و کاربرد آن در بیوتکنولوژی

با توجه به امکان دستکاری توالی‌های ژنوم پلاستیدها و انتقال مجدد توالی‌های دستکاری شده به داخل ژنوم کلروپلاست، امکان مطالعه مکانیسم‌های بیان ژن در کلروپلاست فراهم شده است. این مطالعات، نقش بسیار زیادی در فهم بهتر اصول بیان ژن در پلاستیدها داشته‌اند [۴۱-۴۶]. با استفاده از این دستکاری‌ها و تولید ژن‌های نشانگر شمر^{۳۲}، نتایج بسیار ارزشمندی در شناسایی توالی‌هایی که در تنظیم رونوشت برداری، فراوری RNA و ترجمه ژن‌های کلروپلاست نقش ایفا می‌کنند، بدست آمده است [۴۷-۵۱]. ژنوم پلاستید تعدادی از گیاهان بطور کامل توالی یابی شده‌اند. نتایج این آزمایشات نشان می‌دهند که اکثر این توالی‌ها و سازماندهی آنها در اغلب گیاهان حفظ شده‌اند. اکثر ژن‌های پلاستید به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند: ژن‌های مربوط به سیستم ژنتیکی (از قبیل tRNA، rRNA و ژن‌های پروتئین‌های ریبوزومی) و ژن‌های مربوط به فتوسنتز [۵۲]. علاوه بر ژن‌هایی که شناسایی شده‌اند، ژنوم پلاستید دارای تعدادی ژن می‌باشد که عمل آنها هنوز ناشناخته است که این ژن‌ها اصطلاحاً "ycf^{۳۳}" نامیده می‌شوند. توسعه فناوری انتقال ژن به پلاستید امکان مطالعه عمل این ژن‌ها را فراهم نموده است. در این مطالعات، در اغلب موارد، ژن نشانگر در داخل ژن مورد مطالعه وارد شده و باعث از بین رفتن آن می‌شود. این عمل با توجه به کارایی بالای نوترکیبی توالی‌های هومولوگ در پلاستیدها به سادگی امکانپذیر می‌باشد. سپس، عمل ژن مورد نظر با توجه به تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی ارزیابی می‌شود. این روش مطالعه عمل ژن‌ها، اصطلاحاً "ژنتیک معکوس"^{۳۴} نامیده می‌شود که از آن برای مطالعه عمل ژن‌های کلروپلاست در جلبک سبز و گیاه توتون استفاده زیادی شده است [۵۳-۵۹]. ژنوم ارگانل‌ها محل بسیار مناسبی

هسته منتقل شده است [۳۸]. دلیل اینکه، با وجود تشابه توالی‌های کنترل کننده بیان ژن، چرا *nptII* می‌تواند در ژنوم هسته با فراوانی بالا بیان شود، هنوز ناشناخته می‌باشد. در برخی موارد، موتاسیون-های خودبخودی در توالی ژن 16S DNA که محل عمل آنتی بیوتیک می‌باشد، ایجاد می‌شود که باعث می‌شود که برخی از گیاهان مقاوم به آنتی بیوتیک در واقع ژن نشانگر را نداشته باشند. از آنجا که محل توالی‌هایی که آنتی بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و استرپتومایسین متفاوت است، بنابراین جهش‌های خود بخودی می‌توانند به راحتی با تعویض آنتی بیوتیک در محیط کشت شناسایی و حذف شوند. برای اطمینان از اینکه گیاهان مقاوم ترانس-پلاستومیک بوده و در سطح هموپلاسمی پایدار می‌باشند، از تکنیک ساترن بلات و آزمون نتایج استفاده می‌شود [۸].

مزایای انتقال ژن به پلاستیدها

در اکثر گیاهان گلدار، ژنوم پلاستید از طریق والد ماده به نسل بعد منتقل می‌شود [۳۹]. بنابراین، اگر ژن خارجی به ژنوم پلاستید منتقل شود، احتمال انتقال آن به خویشاوندان وحشی و زراعی از طریق گرده افشانی به حداقل می‌رسد. بنابراین، انتقال ژن به پلاستید موجب کاهش خطر پراکندگی ژن خارجی در محیط و آلودگی منابع ژنتیکی می‌گردد. یکی دیگر از مزایای انتقال ژن به پلاستیدها، امکان بیان همزمان چندین ژن خارجی، بدلیل وجود مکانیسم بیان ژن پلی سیسترونیک^{۳۰} در پلاستیدها می‌باشد [۸، ۱۶]. بعلاوه، انتقال دقیق ژن خارجی به محل خاصی در ژنوم پلاستید از طریق سیستم نوترکیبی توالی‌های مشابه، مشکل اثر محل^{۳۱} و انتقال توالی‌های اضافی پلاسمید که اغلب در انتقال ژن به هسته اتفاق می‌افتند را مرتفع می‌سازد. همچنین، تا کنون خاموشی ژن پس از انجام رونویسی در پلاستیدها گزارش نشده است. سرانجام، بدلیل تعداد نسخه‌های فراوان ژنوم پلاستید، با انتقال ژن به پلاستید امکان تولید مقدار زیادی پروتئین خارجی وجود دارد، که این خاصیت، سیستم انتقال ژن به پلاستید را یک روش بسیار مناسب برای تولید پروتئین‌های دارویی و تقویتی کرده است [۱۸]. همچنین ثابت شده که کلروپلاست‌ها قادر به

³² Chimera

³³ Hypothetical chloroplast reading frame

³⁴ Reverse Genetics

³⁰ Polycistronic gene expression

³¹ Position effect

برای انتقال و بیان ژن‌های خارجی در گیاهان می‌باشد، به ویژه اگر مسئله محیط زیست و حفظ منابع ژنتیکی مطرح باشد. بسیاری از ژن‌های مقاومت به آفات، بیماری‌ها و علف‌کش‌ها به طور موفقیت آمیز در پلاستیدها بیان شده‌اند (جدول ۱).

جدول ۱- برخی از ژن‌های منتقل شده به کلروپلاست در ایجاد مقاومت به آفات، بیماری‌ها، علف‌کش‌ها و تنش‌های محیطی.

نام ژن	عمل ژن	نام گیاه	منبع
<i>cry1Ab</i>	مقاومت به حشرات	کلم	[۶۰]
<i>BvCMO</i>	تولید گلاسیسین بتائین برای مقاومت به شوری و خشکی	توتون	[۶۱]
<i>delta9 desaturase</i>	تغییر ترکیب اسیدهای چرب و ایجاد مقاومت در برابر سرما	توتون	[۶۲]
<i>lecA</i>	ایجاد مقاومت در برابر بیماری <i>amoebiasis</i>	توتون	[۶۳]
<i>cry9Aa2</i>	مقاومت به حشرات	توتون	[۶۴]
<i>cry1Ab</i>	مقاومت به حشرات	سویا	[۶۵]
<i>badh</i>	افزایش مقاومت به شوری	هویج	[۶۶]
<i>bar</i>	مقاومت به علف‌کش	توتون	[۶۷]

جدول ۲- برخی از آزمایشات انتقال ژن به کلروپلاست برای بیان پروتئین‌های نو ترکیب به میزان بالا جهت اهداف صنعتی و دارویی.

نام ژن	عمل ژن	نام گیاه	منبع
<i>HIV-1 Pr55(gag)</i>	تولید آنتی ژن Pr55 برای ایجاد مقاومت در برابر ویروس HIV	توتون	[۷۱]
<i>Pv-16 L1</i>	تولید آنتی ژن L1 برای ایجاد مقاومت در برابر ویروس توتون	توتون	[۷۲]
<i>CSFV-E2</i>	تولید آنتی ژن E2 برای ایجاد مقاومت در برابر ویروس CSFV	توتون	[۷۳]
<i>lycopene beta-cyclase</i>	افزایش میزان بتا-کاروتن	گوجه‌فرنگی	[۳۴]
ژن‌های <i>Phb</i>	تولید پلی‌استر (پلی هیدروکسی بوتیرات PHB)	توتون	[۷۴]
اپرون <i>phb</i>	سنتز پلی‌استر (پلی هیدروکسی بوتیرات PHB)	توتون	[۷۵]
<i>A27L</i>	تولید آنتی ژن A27L برای ایجاد مقاومت در برابر ویروس آبله	توتون	[۷۶]
<i>P24</i>	تولید آنتی ژن P24 برای ایجاد مقاومت در برابر ویروس HIV	توتون	[۷۷]
<i>P24, P24:Nef</i>	تولید آنتی ژنهای P24 و P24:Nef برای ایجاد مقاومت در برابر ویروس HIV	توتون	[۷۸]
<i>LTB-ST</i>	تولید آنتی ژن LTB-ST برای ایجاد مقاومت در برابر باکتری عامل بیماری اسهال (Enterotoxigenic <i>E.coli</i>)	توتون	[۷۹]
<i>CTB-AMA, CTB-MSP1</i>	تولید آنتی ژنهای مقاومت در برابر عوامل بیماری‌های وبا و مالاریا	توتون و کاهو	[۸۰]
<i>RC101, PG1</i>	تولید پپتیدهای ضد میکروبی Retrocyclin-101 و Protegrin-1	توتون	[۸۱]

اخیراً^{۳۵} چندین روش برای حذف ژن‌های انتخابگر از گیاهان تراریخت پس از انتقال موفق ژن‌های مورد نظر معرفی شده‌اند [۶۸-۷۰]. در چندین مورد، فناوری انتقال ژن به پلاستید برای بیان پروتئین‌های نو ترکیب به میزان بالا جهت اهداف صنعتی و دارویی مورد استفاده قرار گرفته است (جدول ۲). سیستم‌های بیان ژن در کلروپلاست‌های سبز برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب در سطوح تجاری بسیار مناسب می‌باشند [۱۸]. در حال حاضر، دانشمندان توجه بسیار زیادی به تولید پروتئین‌های نو ترکیب با خاصیت دارویی در گیاهان غیرسمی خوراکی از قبیل گوجه فرنگی، دارند. این روش نه تنها هزینه استخراج و خالص سازی را به حداقل می‌رساند، بلکه می‌تواند شبکه‌های مستقیم تولید و عرضه داروهای پروتئینی خوراکی را نیز فراهم کند. اخیراً^{۳۶} ووربس و همکاران موفق شدند که با انتقال ژن به کلروپلاست، مسیر سنتز کارتنوئیدها^{۳۶} در پلاستیدهای گوجه فرنگی را در جهت افزایش ارزش غذایی آن با افزایش میزان بتا-کاروتن (پیش ماده ویتامین A)، اصلاح کنند [۳۴].

توسعه انتقال ژن به پلاستید در گیاهان

برای اولین بار، انتقال موفق ژن به کلروپلاست توسط بویتون و همکاران برای جلبک سبز تک سلولی کلامیدوموناس (*Chlamydomonas reinhardtii*) گزارش گردید [۸۲] و پس از مدت کوتاهی این فناوری برای مهندسی ژنتیکی گیاه توتون (*Nicotiana tabacum*) از تیره سولاناسه (*Solanaceae*) بکار گرفته شد [۳۰]. در اکثر آزمایشگاه‌ها، هم اکنون انتقال ژن به پلاستید در توتون معمول است و برای بهینه سازی سیستم انتقال ژن به پلاستید و توسعه این فناوری به گیاهان دیگر و همچنین مطالعه عمل ژن‌های ژنوم پلاستید مورد استفاده قرار می‌گیرد. انتقال ژن به پلاستید، همچنین در چندین گونه از تیره سولاناسه از قبیل سیب زمینی [۸۳]، گوجه فرنگی [۲۹] و گل اطلسی [۸۴]، البته با بازده پایین تری نسبت به توتون گزارش شده است. در مورد سیب زمینی، گیاهان تراریخت عقیم بوده و بذور ترانس-

^{۳۵} Wurbs

^{۳۶} Carotenoids

پلاستومیک نتوانستند تولید شوند. در گیاهان سایر تیره‌ها، انتقال ژن به پلاستید بسیار مشکلتر بوده است. در آرابیدوپسیس که یک گیاه مدل در مطالعات بیولوژیکی و از تیره براسیکاسه (*Brassicaceae*) می‌باشد، انتقال ژن به کلروپلاست گزارش شده است، ولی بازده آن بسیار پایین بوده و گیاهان تراریخت عقیم بودند [۸۵]. اخیراً^{۳۷} گیاهان ترانس-پلاستومیک در گیاه *Lesquerella fendleri* از تیره براسیکاسه [۸۶]، سویا از تیره فاباسه (*Fabaceae*) [۸۷]، پنبه از تیره مالواسه (*Malvaceae*) [۸۸]، کاهو از تیره استراسه (*Asteraceae*) [۸۹] و چغندر قند از تیره *Chenopodiaceae* [۹۰] با راندمان خیلی پایین تولید شده اند. همچنین، انتقال ژن به پلاستید در کشت‌های سوسپانسیون سلولی هویج گزارش شده است، اما بارور بودن گیاهان تراریخت مشخص نشده است [۶۶]. در کلزا از تیره براسیکاسه، تنها تولید گیاهان هتروپلاسمیک گزارش شده است [۹۱]. همچنین در برنج، با وجود اینکه گیاهان هتروپلاسمیک تولید شده بودند، مرحله هموپلاسمیک هرگز بدست نیامده است [۹۲، ۹۳]. اخیراً نیز انتقال ژن به کلروپلاست‌های گیاه بادنجان (*Solanum melongena* L.) از تیره سولاناسه با موفقیت انجام گرفت. با این حال، کارایی انتقال ژن در این گیاه باز هم فاصله زیادی با بازده انتقال ژن به کلروپلاست در توتون دارد (۹۴).

محدودیت‌های موجود در توسعه و کاربرد فناوری انتقال ژن به پلاستید در گیاهان

توسعه سیستم انتقال به پلاستید در گیاهان عالی چندین مرحله مهم نیاز دارد. سیستم‌های کارآمد کشت بافت با قابلیت باززایی گیاه بطور متوالی از اهمیت خاصی در انتقال ژن به ارگانل‌ها برخوردار است. بطور کلی، دو منبع مواد گیاهی می‌توانند در آزمایشات انتقال ژن به پلاستید مورد استفاده قرار می‌گیرند: (الف) کشت‌های کالوس که قابلیت باززایی دارند [۲۸، ۸۲، ۹۳]، و (ب) قطعات برگ [۲۷، ۳۰، ۳۸، ۸۹، ۹۰، ۹۵]. اکثر گیاهان دولپه از قبیل تنباکو، قابلیت باززایی از طریق ارگان‌زایی^{۳۷} در زیر نور را دارند، که یک سیستم باززایی کارآمد برای تولید گیاهان ترانس-

^{۳۷} Organogenesis

پلاستومیک از سلول‌های تراریخت اولیه فراهم می‌کند. در مقابل، تک‌لپه‌ای‌ها، مخصوصاً "تیره Poaceae، در برابر باززایی از طریق ارگان‌زایی مقاومت می‌کنند و معمولاً" باززایی این گیاهان از طریق جنین‌زایی سوماتیکی³⁸ صورت می‌گیرد که اغلب به یک دوره تاریکی نیاز دارد [۹۶]. در انتقال ژن به کلروپلاست، برای حذف نسخه‌های وحشی ژنوم پلاستیدو بدست آوردن مرحله پایدار هوموپلاسمی، چندین دور متوالی گزینش و باززایی گیاه نیاز می‌باشد [۸]. این دورهای متوالی گزینش و باززایی معمولاً" با انتقال قطعه‌های کوچک برگ از گیاهان تراریخت اولیه و قرار دادن آنها در دور جدید باززایی روی محیط حاوی مقادیر بالاتری از آنتی بیوتیک اختصاصی انجام می‌شوند [۸،۹]. در حقیقت، عدم امکان انجام دورهای متوالی گزینش و باززایی در اکثر گیاهان زراعی، از جمله غلات، دلیل اصلی عدم موفقیت در تولید گیاهان ترانس-پلاستومیک عنوان شده است [۹۲،۹۶]. بطوریکه پلاستید سلول‌های کشت شده برنج براحثی می‌توانستند تراریخت شوند، در حالیکه همه تلاش‌ها برای تولید گیاهان هوموپلاسمیک تا بحال بی نتیجه مانده‌اند [۹۲،۹۳]. از طرف دیگر، در سیستم‌های کشت بافت که بر پایه جنین‌زایی سوماتیکی می‌باشند، برای القای بهتر جنین‌زایی، اغلب کشت‌ها در محیط تاریک انجام می‌شوند. در این نوع کشت‌ها، پلاستیدها نسبتاً" کوچک و توسعه نیافته و در سلول‌ها پراکنده‌اند [۹۷]، در حالیکه بافت برگی که در اغلب آزمایشات انتقال ژن به پلاستیدها مورد استفاده قرار می‌گیرد، دارای تعداد زیادی کلروپلاست توسعه یافته می‌باشد. زمانی تصور می‌شد که این می‌تواند یک عامل مهم در افزایش احتمال انتقال ژن به پلاستید در کلروپلاست‌های سبز باشند. علی‌رغم این تفاوت‌های آشکار، برخی از مطالعات نشان می‌دهند که فراوانی انتقال ژن به پلاستید در کشت‌های سوسپانسیون سلولی تنباکو که حاوی پلاستیدهای تمایز نیافته هستند، تقریباً" با فراوانی انتقال ژن به کلروپلاست‌های سبز با استفاده از قطعات برگ، برابری می‌کند [۲۸]. این موضوع قبلاً" نیز بوسیله آزمایشات انجام شده روی انتقال ژن به پلاستید با استفاده از کشت‌های سوسپانسیون سلولی برنج به اثبات رسیده بود [۹۲]. در سال‌های اخیر، انتقال ژن به

³⁸ Somatic embryogenesis

پلاستید با استفاده از سیستم جنین‌زایی سوماتیکی و استفاده از سلول‌های غیرسبز بعنوان بافت هدف، در گیاه هویج [۶۶]، پنبه [۸۸] و سویا [۸۷] گزارش شده است. این نتایج نشان می‌دهند که در واقع، هیچ گونه مانعی برای تراریخت کردن انواع دیگر پلاستیدها غیر از کلروپلاست وجود ندارد. به نظر می‌رسد که عدم وجود ژن‌های نشانگر معتبر، یک محدودیت اصلی دیگر برای توسعه انتقال ژن به پلاستید می‌باشد. تا به حال ژن نشانگر *aadA* که در برابر آنتی بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و استرپتومایسین ایجاد مقاومت می‌کند، در اکثر آزمایشات توسعه سیستم انتقال ژن به پلاستید در گونه‌های دولپه مورد استفاده قرار گرفته است [۲۷،۲۹،۳۲،۳۶،۸۳،۸۴،۸۶،۸۷،۸۹،۹۵،۹۸]. معمولاً"، ابتدا گیاهان مقاوم به آنتی بیوتیک روی محیط کشت حاوی اسپکتینومایسین گزینش می‌شوند و سپس روی محیط حاوی استرپتومایسین قرار داده می‌شوند تا گیاهان مقاوم به اسپکتینومایسین که در اثر جهش-های خودبخودی در ژنوم پلاستید ایجاد می‌شوند، حذف شوند. گیاهان تک‌لپه به طور طبیعی در برابر آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین مقاوم هستند [۸۴]. همچنین نتایج آزمایشات دیگر نشان داده‌اند که در شرایط تاریکی، استرپتومایسین حتی در غلظت‌های بالا از رشد سلول‌های گیاهان تک‌لپه به طور کامل ممانعت نمی‌کند (نتایج چاپ نشده از نویسنده). از طرف دیگر، انتقال ژن از طریق سیستم کشت بافت جنین‌زایی، اغلب به یک دوره گزینش در تاریکی نیازمند است تا از سلول‌های تراریخت شده جنین‌های سوماتیکی جدید تولید شوند و نهایتاً" در شرایط روشنائی به گیاه کامل باززا شوند. بنابراین با گزینش در تاریکی با استفاده از آنتی بیوتیک استرپتومایسین، احتمال اینکه سلول‌های غیرتراریخت برای رشد با سلول‌های تراریخت رقابت کرده و با توجه به تعداد محدود سلول‌های تراریخت شده برای آنها شانس کمتری جهت زنده ماندن باقی گذارند، زیاد می‌باشد.

یک احتمال دیگر برای موفقیت کم در باززایی گیاهان تراریخت از سلول‌های کشت شده در شرایط تاریکی، می‌تواند میزان پایین بیان ژن در پلاستیدهای غیرسبز باشد. در اکثر آزمایشات انتقال ژن به پلاستید از پروموتور *Prm* استفاده می‌شود که معمولاً" دارای

توسعه انتقال ژن به پلاستید در تک لپه‌ای ها بکند. همچنین استفاده از وکتورهای جدید می‌تواند در کارایی انتقال ژن به پلاستید موثر باشد. برای مثال وکتورهایی که توالی‌های هومولوگ آنها حاوی توالی‌های Ori⁴¹ (که منشا همانندسازی ژنوم پلاستیدها می‌باشند) می‌باشند، می‌توانند از طریق افزایش سریعتر تعداد نسخه‌های ژنوم ترا ریخت شده، میزان بیان ژن نشانگر و در نتیجه احتمال باززایی گیاه ترانس-پلاستومیک را افزایش دهد.

منابع

1. Aldridge C, Maple J, Moller SG (2005) The molecular biology of plastid division in higher plants. *J Exp Bot*, 56(414):1061-1077.
2. Galili G (1995) Regulation of Lysine and Threonine Synthesis. *Plant Cell*, 7(7):899-906.
3. Ohlrogge J, Browse J (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, 7(7):957-970.
4. Bock R (2005) Extranuclear inheritance: Gene transfer out of plastids. *Progress in Botany*, 67:75-98.
5. McFadden GI (2001) Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *Journal of Phycology*, 37(6):951-959
6. Martin W, Herrmann RG (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol*, 118(1):9-17.
7. Martin W, 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 U S A*, 99(19):12246-12251.
8. Bock R (2001) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J Mol Biol*, 312(3):425-438.
9. Maliga P (2004) Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol*, 55:289-313.
10. Westhoff P, Herrmann RG (1988) Complex RNA maturation in chloroplasts. The psbB operon from spinach. *Eur J Biochem*, 171(3):551-564.
11. Maier RM, Zeltz P, Kossel H, Bonnard G, Gualberto JM, Grienberger JM (1996) RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol*, 32(1-2):343-365.

⁴¹ Origin of replication

هر دو توالی نوکلئوتیدی ³⁹NEP (که توسط RNA پلیمرازی که در هسته ساخته می‌شود، شناسایی می‌شود) و PEP⁴⁰ (که توسط RNA پلیمرازی که توسط پلاستید ساخته می‌شود، شناسایی می‌شود) می‌باشد. چنین به نظر می‌رسد که این پروموتور در هر دو نوع پلاستید سبز (کلروپلاست) و غیرسبز فعال می‌باشد [۱۷]. با این وجود، در تمام سیستم‌های انتقال ژن به پلاستید که تا بحال گزارش شده‌اند، گزینش گیاهان ترانس-پلاستومیک در شرایط روشنائی انجام شده و هیچ مدرکی مبنی بر امکان گزینش سلول-های ترانس-پلاستومیک در شرایط تاریکی وجود ندارد. آزمایشات اخیر نشان می‌دهند که میزان RNA پلیمراز تولید شده توسط پلاستیدها (PEP) در شرایط روشنائی افزایش می‌یابد [۱۴،۹۹]. این نشان می‌دهد که میزان بیان ژن‌های پلاستیدها در شرایط روشنائی بدلیل فعالیت هر دو نوع آنزیم RNA پلیمراز (NEP و PEP) بیشتر می‌باشد. از آنجا که در مراحل اولیه انتقال ژن به پلاستید تنها یک یا چند ژنوم پلاستید ترا ریخت می‌شوند، بنابراین شدت پایین بیان ژن نشانگر در مراحل اولیه گزینش، می‌تواند یکی از مهمترین دلایل عدم موفقیت در انتقال ژن به پلاستید در شرایط تاریکی با استفاده از سیستم‌های باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی باشد. بنابراین، استفاده از سیستم‌هایی که میزان بیان ژن نشانگر را در مراحل اولیه گزینش افزایش دهد، می‌تواند در توسعه سیستم انتقال ژن به پلاستید در گیاهان مهم زراعی از اهمیت بالایی برخوردار باشد. مثلاً، در پنبه وقتی که دو ژن نشانگر *nptII* و *aphA-6* (که هر دو باعث ایجاد مقاومت در برابر آنتی بیوتیک کانامایسین می‌شوند) بطور همزمان استفاده شدند، گیاهان ترانس-پلاستومیک با فراوانی بالاتری نسبت به حالتی که تنها *aphA-6* استفاده شد، بدست آمدند [۸۸]. بنابراین، شناسایی پروموتورهایی که در پلاستیدهای غیرسبز دارای فعالیت بالاتری هستند، می‌تواند برای توسعه فناوری انتقال ژن به پلاستید در کشت‌های جنین‌زا که در شرایط تاریکی پرورش می‌یابند، مفید واقع شود. همچنین، شناسایی توالی‌های تشدید کننده ترجمه ژن‌های پلاستید در شرایط تاریکی، می‌تواند کمک زیادی به

³⁹ Nuclear Encoded RNA Polymerase

⁴⁰ Plastid Encoded RNA Polymerase

12. Sugita M, Sugiura M (1996) Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant Mol Biol*, 32(1-2):315-326.
13. Igloi GL, Kössel H (1992) The Transcriptional Apparatus of Chloroplasts. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(6):525-558.
14. Allison LA (2000) The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie*, 82(6-7):537-548.
15. Hajdukiewicz PT, Allison LA, Maliga P (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *Embo J*, 16(13):4041-4048.
16. Bock R, Khan MS (2004) Taming plastids for a green future. *Trends Biotechnol*, 22(6):311-318.
17. Daniell H, Kumar S, Dufourmantel N (2005) Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *Trends Biotechnol*, 23(5):238-245.
18. Daniell H (2006) Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol J*, 1(10):1071-1079.
19. Herz S, Fussl M, Steiger S, Koop HU (2005) Development of novel types of plastid transformation vectors and evaluation of factors controlling expression. *Transgenic Res*, 14(6):969-982.
20. Manuell A, Beligni MV, Yamaguchi K, Mayfield SP (2004) Regulation of chloroplast translation: interactions of RNA elements, RNA-binding proteins and the plastid ribosome. *Biochem Soc Trans*, 32(Pt4):601-605.
21. Zerges W (2000) Translation in chloroplasts. *Biochimie*, 82(6-7):583-601.
22. Sugiura M, Hirose T, Sugita M (1998) Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annu Rev Genet*, 32:437-459.
23. Warzecha H (2008) Biopharmaceuticals from Plants: A Multitude of Options for Posttranslational Modifications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25:315-330.
24. Staub JM, Garcia B, Graves J, Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye G, Russell DA (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol*, 18(3):333-338.
25. Pyke KA (1999) Plastid division and development. *Plant Cell*, 11(4):549-556.
26. Lohse M, Drechsel O, Bock R (2007) OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW): a tool for the easy generation of high-quality custom graphical maps of plastid and mitochondrial genomes. *Curr Genet*, 52(5-6):267-274.
27. Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, Okumura S, Takase H, Hattori M, Yokota A, Tomizawa K (2006) Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Res*, 15(2):205-217.
28. Langbecker CL, Ye GN, Broyles DL, Duggan LL, Xu CW, Hajdukiewicz PT, Armstrong CL, Staub JM (2004) High-frequency transformation of undeveloped plastids in tobacco suspension cells. *Plant Physiol*, 135(1):39-46.
29. 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. *Nat Biotechnol*, 19(9):870-875.
30. Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(21):8526-8530.
31. Golds T, Maliga P, Koop HU (1993) Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Bio/Technology*, 11:95-97.
32. O'Neill C, Horvath GV, Horvath E, Dix PJ, Medgyesy P (1993) Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *Plant J*, 3(5):729-738.
33. van Bel AJ, Hibberd J, Prufer D, Knoblauch M (2001) Novel approach in plastid transformation. *Curr Opin Biotechnol*, 12(2):144-149.
34. Wurbs D, Ruf S, Bock R (2007) Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *Plant J*, 49(2):276-288.
35. Bendich AJ (1987) Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *Bioessays*, 6(6):279-282.
36. Goldschmidt-Clermont M (1991) Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res*, 19(15):4083-4089.
37. Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(3):913-917.
38. Carrer H, Hockenberry TN, Svab Z, Maliga P (1993) Kanamycin resistance as a selectable marker for

plastid transformation in tobacco. *Mol Gen Genet*, 241(1-2):49-56.

39. Zhang Q, Liu Y, Sodmergen (2003) Examination of the cytoplasmic DNA in male reproductive cells to determine the potential for cytoplasmic inheritance in 295 angiosperm species. *Plant Cell Physiol*, 44(9):941-951.

40. Bogorad L (2000) Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol*, 18(6):257-263.

41. Bock R (1998) Analysis of RNA editing in plastids. *Methods*, 15(1):75-83.

42. Bock R (2000) Sense from nonsense: how the genetic information of chloroplasts is altered by RNA editing. *Biochimie*, 82(6-7):549-557.

43. Barkan A (2000) Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie*, 82(6-7):559-572.

44. Doetsch NA, Favreau M R, Kuscuglu N, Thompson MD, Hallick RB (2001) Chloroplast transformation in *Euglena gracilis*: splicing of a group II twintron transcribed from a transgenic *psbK* operon. *Curr Genet*, 39(1):49-60.

45. Goldschmidt-Clermont M (1998) Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Int Rev Cytol*, 177:115-180.

46. Nickelsen J, Kuck U (2000) The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as an experimental system to study chloroplast RNA metabolism. *Naturwissenschaften*, 87(3): 97-107.

47. Allison LAM P (1995) Light-responsive and transcription-enhancing elements regulate the plastid *psbD* core promoter. *EMBO J*, 14(15):3721-3730.

48. Blowers AD, Ellmore GA, Klein U, Bogorad L (1990) Transcriptional analysis of endogenous and foreign genes in chloroplast transformants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell*, 2(11):1059-1070.

49. Eibl C, Zou Z, Beck A, Kim M, Mullet J, Koop HU (1999) In vivo analysis of plastid *psbA*, *rbcl* and *rpl32* UTR elements by chloroplast transformation: tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. *Plant J*, 19(3):333-345.

50. Sakamoto W, Kindle KL, Stern DB (1993) In vivo analysis of *Chlamydomonas* chloroplast *petD* gene expression using stable transformation of *b-glucuronidase* translational fusions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(2):497-450.

51. Staub JM, Maliga P (1994) Translation of the *psbA* mRNA is regulated by light via the 50-untranslated region in tobacco plastids. *Plant J*, 6(16):547-553.

52. Shimada H, Sugiura M (1991) Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes. *Nucl Acids Res* 19(5): 983-995.

53. Burrows PA, Sazanov LA, Svab Z, Maliga P, Nixon PJ (1998) Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J*, 17(4):868-876.

54. Hager M, Biehler K, Illerhaus J, Ruf S, Bock R (1999) Targeted inactivation of the smallest plastid genome-encoded open reading frame reveals a novel and essential subunit of the cytochrome *b6f* complex. *EMBO J*, 18(21):5834-5842.

55. Monod C, Takahashi Y, Goldschmidt-Clermont M, Rochaix JD (1994) The chloroplast *ycf8* open reading frame encodes a photosystem II polypeptide which maintains photosynthetic activity under adverse growth conditions. *EMBO J*, 13(12):2747-2754.

56. Rolland N, Dorne AJ, Amoroso G, Sültemeyer DF, Joyard J, Rochaix JD (1997) Disruption of the plastid *ycf10* open reading frame affects uptake of inorganic carbon in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *EMBO J*, 16(22):6713-6726.

57. Ruf S, Kössel H, Bock R (1997) Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene. *J Cell Biol*, 139(1):95-102.

58. Ruf S, Biehler K, Bock R (2000) A small chloroplast-encoded protein as a novel architectural component of the light-harvesting antenna. *J Cell Biol*, 149(2):369-377.

Takahashi Y, Rahire M, Breyton C, Popot JL, Joliot P, Rochaix JD (1996) The chloroplast *ycf7* (*petL*) open reading frame of *Chlamydomonas reinhardtii* encodes a small functionally important subunit of the cytochrome *b6f* complex. *EMBO J*, 15(14):3498-3506.

60. Liu CW, Lin CC, Yiu JC, Chen JJ, Tseng MJ (2008) Expression of a *Bacillus thuringiensis* toxin (*cry1Ab*) gene in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) chloroplasts confers high insecticidal efficacy against *Plutella xylostella*. *Theor Appl Genet*, 117(1):75-88.

61. Zhang J, Tan W, Yang XH, Zhang, HX (2008) Plastid-expressed choline monooxygenase gene improves salt and drought tolerance through accumulation of glycine betaine in tobacco. *Plant Cell Rep*, 27(6):1113-1124.

62. Craig W, Lenzi P, Scotti N, De Palma M, Saggese P, Carbone V, McGrath Curran N, Magee A, Medgyesy P, Kavanagh T, Dix P, Grillo S, Cardi T (2008) Transplastomic tobacco plants expressing a fatty acid desaturase gene exhibit altered fatty acid profiles and improved cold tolerance. *Transgenic Res*, 17(5): 769-82.
63. Chebolu S, Daniell H (2007) Stable expression of Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis. *Plant Biotechnol J*, 5(2):230-239.
64. Chakrabarti SK, Lutz KA, Lertwiriawong B, Svab Z, Maliga P (2006) Expression of the cry9Aa2 B.t. gene in tobacco chloroplasts confers resistance to potato tuber moth. *Transgenic Res*, 15(4):481-488.
65. 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(5):659-668.
66. 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.
67. Kang T, Seo J, Loc N, Yang M (2003) Herbicide resistance of tobacco chloroplasts expressing the bar gene. *Mol Cells*, 16(1):60-66.
68. Corneille S, Lutz K, Svab Z, Maliga P (2001) Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system. *Plant J*, 27(2):171-178.
69. Klaus SM, Huang FC, Golds TJ, Koop HU (2004) Generation of marker-free plastid transformants using a transiently cointegrated selection gene. *Nat Biotechnol*, 22(2):225-229.
70. Lutz KA, Bosacchi MH, Maliga P (2006) Plastid marker-gene excision by transiently expressed CRE recombinase. *Plant J*, 45(3):447-456.
71. Scotti N, Alagna F, Ferraiolo E, Formisano G, Sannino L, Buonaguro L, De Stradis A, Vitale A, Monti L, Grillo S, Buonaguro FM, Cardi T (2009) High-level expression of the HIV-1 Pr55(gag) polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts. *Planta*, 229(5):1109-1122.
72. Lenzi P, Scotti N, Alagna F, Tornesello ML, Pompa A, Vitale A, De Stradis A, Monti L, Grillo S, Buonaguro FM, Maliga P, Cardi T (2008) Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco. *Transgenic Res*, 17(6):1091-1102.
73. Shao H, He D, Qian K, Shen G, Su Z (2008) The expression of classical swine fever virus structural protein E2 gene in tobacco chloroplasts for applying chloroplasts as bioreactors. *C R Biol* 331(3):179-184.
74. Arai Y, Shikanai T, Doi Y, Yoshida S, Yamaguchi I, Nakashita H (2004) Production of polyhydroxybutyrate by polycistronic expression of bacterial genes in tobacco plastid. *Plant Cell Physiol* 45(9):1176-1184.
75. Lossl A, Eibl C, Harloff HJ, Jung C, Koop HU (2003) Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Rep*, 21(9):891-899.
76. Rigano MM, Giulini A, Pedrazzini E, Capobianchi M, Castilletti C, Di Caro A, Ippolito G, Beggio P, De Giuli Morghen C, Monti L, Vitale A, Cardi T (2009) Transgenic chloroplasts are efficient sites for high-yield production of the vaccinia virus envelope protein A27L in plant cells. *Plant Biotechnol J*, 7: 577-591.
77. McCabe MS, Klaas M, Gonzalez-Rabade N, Poage M, Badillo-Corona JA, Zhou F, Karcher D, Bock R, Gray JC, Dix PJ (2008) Plastid transformation of high-biomass tobacco variety Maryland Mammoth for production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen. *Plant Biotechnol J* 6: 914-929.
78. Zhou F, Badillo-Corona JA, Karcher D, Gonzalez-Rabade N, Piepenburg K, Borchers A-MI, Maloney AP, Kavanagh TA, Gray JC, Bock R (2008) High-level expression of HIV antigens from the tobacco and tomato plastid genomes. *Plant Biotechnol J*, 6: 897-913.
79. Rosales-Mendoza S, Alpuche-Solís AG, Soria-Guerra RE, Moreno-Fierros L, Martínez-González L, Herrera-Díaz A, Korban SS (2009) Expression of an *Escherichia coli* antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants. *Plant J*, 57(1): 45-54.
80. Davoodi-Semiromi A, Schreiber M, Nalapalli S, Verma D, Singh ND, Banks RK, Chakrabarti D, Daniell H (2010) Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. *Plant Biotechnol J*, 8(2): 223-42.
81. Lee SB, Li B, Jin S, Daniell H (2010) Expression and characterization of antimicrobial peptides Retrocyclin-101 and Protegrin-1 in chloroplasts to control viral and bacterial infections. *Plant Biotechnol J*. Published online, 2010 Jun 9, Ahead of print.
82. Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL,

- Robertson D, Klein TM, Shark KB, et al. (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 240(4858):1534-1538.
83. 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(2):209-216.
84. Zubko MK, Zubko EI, van Zuilen K, Meyer P, Day A (2004) Stable transformation of petunia plastids. *Transgenic Res*, 13(6):523-530.
85. Sikdar SR, Serino G, Chaudhuri S, Maliga P (1998) Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*, 18:20-24.
86. Skarjinskaia M, Svab Z, Maliga P (2003) Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicacea. *Transgenic Res*, 12(1):115-122.
87. Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, Peltier G, Ferullo JM, Tissot G (2004) Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol Biol*, 55(4):479-489.
88. Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004) Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol Biol*, 56(2):203-216.
89. Lelivelt CL, McCabe MS, Newell CA, Desnoo 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(6):763-774.
90. De Marchis F, Wang Y, Stevanato P, Arcioni S, Bellucci M (2009) Genetic transformation of the sugar beet plastome. *Transgenic Res*, 18(1):17-30.
91. 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.
92. Khan MS, Maliga P (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol*, 17(9):910-915.
93. 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(3):401-410.
94. Singh AK, Verma SS, Bansal KC (2010) Plastid transformation in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Transgenic Res*, 19(1): 113-119 .
95. Okumura S, Sawada M, Park YW, Hayashi T, Shimamura M, Takase H, Tomizawa K (2006) Transformation of poplar (*Populus alba*) plastids and expression of foreign proteins in tree chloroplasts. *Transgenic Res*, 15(5):637-646.
96. Ahmadabadi M, Ruf S, Bock R (2007) A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Res*, 16(4):437-448.
97. Waters MT, Fray RG, Pyke KA (2004) Stromule formation is dependent upon plastid size, plastid differentiation status and the density of plastids within the cell. *Plant J*, 39(4):655-667.
98. Koop HU, Steinmuller K, Wagner H, Rossler C, Eibl C, Sacher L (1996) Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta*, 199(2):193-201.
99. Tsunoyama Y, Ishizaki Y, Morikawa K, Kobori M, Nakahira Y, Takeba G, Toyoshima Y, Shiina T (2004) Blue light-induced transcription of plastid-encoded psbD gene is mediated by a nuclear-encoded transcription initiation factor, AtSig5. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(9):3304-3309.

