

· 专题论坛 ·

病毒介导的植物基因组编辑技术研究进展

胡丹玲, 孙永伟*

内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010000

摘要 CRISPR/Cas作为一种新兴的靶向基因组编辑技术, 具有操作过程简便、编辑效率高和支持多靶点编辑等优势, 在植物遗传育种中应用前景广阔。然而对于一些尚未建立遗传转化体系和再生体系的植物, 基因组编辑技术的应用仍然受限。病毒介导的植物基因组编辑技术可不依赖遗传转化和再生等步骤, 即可快速获得无外源转基因成分的基因组编辑植物, 受到广泛关注。该文主要介绍了病毒介导的CRISPR/Cas植物基因组编辑技术的工作原理及优势, 系统总结了该技术在植物基因组编辑领域的应用现状, 并重点讨论了该技术体系存在的问题及挑战, 以期为进一步开展这一领域研究提供参考。

关键词 病毒, 植物, 基因组编辑, CRISPR/Cas

胡丹玲, 孙永伟 (2024). 病毒介导的植物基因组编辑技术研究进展. *植物学报* 59, 452–462.

CRISPR/Cas9系统是继ZFNs和TALENs技术之后出现的基因组定点编辑新技术, 是由Cas9蛋白和向导RNA (sgRNA)构成的RNA-蛋白质复合物, Cas9蛋白含有HNH和RuvC两个内切酶结构域。CRISPR/Cas9系统利用sgRNA识别并结合特定DNA序列, 引导Cas9蛋白靶向DNA双链进行切割, 造成DNA双链断裂, 并诱导细胞进行DNA自我修复, 修复模式主要包括非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)以及同源重组修复(homology directed repair, HDR)两种, 进而实现对目的基因的功能性敲除或敲入(Jinek et al., 2012)。由于该方法具有方便、快捷、高效和精确等优点, 更适宜规模化高通量操作, 展现出广阔的发展潜力和应用前景, 成为基因定向编辑的最强有力工具之一(Barrangou, 2014; Gao, 2018; Bernabé-Orts et al., 2019; 刘耀光等, 2019; 苏钺凯等, 2019; Li and Xia, 2020; Zhan et al., 2021; 何晓玲等, 2022)。

病毒是一种理想的外源DNA/RNA传递及瞬时表达工具。在医学领域, 利用腺相关病毒(Adeno-associated virus, AAV)包装和体内递送CRISPR/Cas成分是当前基因治疗最有前景的系统之一, 在多种遗传病

的治疗临床试验中效果良好(Wang et al., 2019; Yip, 2020)。在植物科学领域, 病毒介导的植物基因组编辑技术无须组织培养及再生过程即可以获得不含外源转基因成分的基因组编辑植株, 备受研究者青睐, 相关技术方法也在不断优化和升级(Liu and Zhang, 2020)。本文主要介绍了病毒介导的CRISPR/Cas植物基因组编辑技术的工作原理及优势, 系统总结了该技术在植物基因组编辑领域的应用现状, 重点讨论了该体系目前的技术瓶颈并展望了未来的应用前景。

1 植物中CRISPR/Cas介导的基因组编辑技术研究现状及主要应用瓶颈

目前, 基于CRISPR/Cas方法的基因组编辑技术已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)和小麦(*Triticum aestivum*)等多种植物中得到应用, 然而尚存在两个主要限制条件: (1) 通常植物基因组编辑依赖农杆菌或基因枪介导等方法将CRISPR/Cas主要成分导入受体植物细胞, 并通过组织培养和再生等途径获得稳定整合的转基因植株, 然后进一步鉴定获得靶基因位点发生遗传修饰的植株。但由于生物形态转化易导致组织损失, 而农杆菌容易引起组织褐变

收稿日期: 2023-04-07; 接受日期: 2023-08-07

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(No.31800206)、国家自然科学基金地区科学基金(No.32160111)和内蒙古自治区自然科学基金面上项目(No.2020MS03027)

* 通讯作者。E-mail: sunyongwei@imu.edu.cn

和坏死,且使用农杆菌转化单子叶植物困难。据统计,自然界中约有370 000种高等植物,然而目前仅有不到0.1%的物种可通过转基因手段进行遗传改良,所以对于一些尚未建立遗传转化体系和再生体系的植物,基因组编辑技术的应用仍然受到限制(Cao et al., 2022)。(2) 部分植物稳定遗传的转化效率较低,且易诱发体细胞突变,此外还存在外源DNA片段插入植物基因组的可能性。虽然插入的外源基因可通过自交或回交手段从后代植株染色体中分离去除,进而获得无外源转基因成分的编辑植株,但过程复杂且操作困难。加之,目前部分国家和地区基因组编辑植物受到严格监管,虽然相关科研人员已开发出多种快速获得非转基因编辑植株的方法(Liang et al., 2017; Chen et al., 2019; Li et al., 2019; He et al., 2020),但其操作过程仍然费时费力,尤其是对一些倍性复杂、育种周期长和无性繁殖的植物更是如此。因此,寻找一种基因型及物种限制较小,且无须经过遗传转化和再生等过程的基因组编辑方法成为当前主要的研究热点之一(Liu and Zhang, 2020)。

2 病毒介导的植物基因组编辑技术

病毒介导的植物基因组编辑技术是指以病毒为载体,将CRISPR/Cas9系统等基因组编辑工具导入植物细胞中进行基因组编辑的技术。其原理是利用病毒对宿主细胞的高侵染能力,将基因组编辑的功能元件转移至宿主细胞,通过病毒复制和传播使编辑工具在宿主细胞中表达并实现基因组编辑。该过程分为4步:(1) 构建病毒介导的基因组编辑载体,并选择合适的基因组编辑工具。例如,CRISPR/Cas9系统,根据目标基因序列设计靶序列,在不影响病毒侵染能力的前提下将基因组编辑成分整合至病毒基因组序列中。(2) 获得可实现基因组编辑的病毒。目前主要通过2种方式获得具有侵染能力的病毒:一是体外直接合成含有可实现基因组编辑成分的病毒mRNA;二是可将表达基因组编辑成分的质粒DNA转入农杆菌,利用农杆菌侵染烟草(*Nicotiana tabacum*)等植物,获得具有侵染能力的病毒。(3) 病毒侵染植物细胞。通过病毒侵染植物细胞,将基因组编辑元件导入植物细胞中,实现靶标基因的定点编辑。(4) 获得可遗传的基因组编辑植株。通过组织培养或改造病毒,添加可移动RNA

元件,使病毒能直接侵染茎尖分生组织或花器官,获得可遗传的基因组编辑植株(图1)。

病毒介导的植物基因组编辑技术可在植株个体水平递送CRISPR/Cas主要成分,进而高效完成基因组编辑,此过程既不依赖遗传转化,也无须分离特定的受体细胞或组织,并且通过该方法获得的基因组编辑植物不含任何外源转基因成分。因此,该方法的应用将有助于加速作物育种进程、降低监管成本并推动基因组编辑作物的产业化进程。

植物病毒可按其遗传物质的不同分为4类,即单链RNA、双链RNA、单链DNA和双链DNA病毒。其中,单链RNA病毒又可按基因RNA复制和表达方式的不同分为正链RNA和负链RNA病毒两种。目前,用于病毒介导的植物基因组编辑的主要为正链RNA、负链RNA及双链DNA病毒,经改造后被用于递送CRISPR/Cas成分并在多种植物中实现了基因组编辑。

2.1 正链RNA病毒介导的CRISPR/Cas基因组编辑技术

据报道,约有70%的植物病毒属于正链RNA病毒,是目前用于病毒介导的基因组编辑最多的病毒类型(表1)。其主要包括烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)、烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)、豌豆早枯病毒(pea early-browning virus, PEBV)、苹果潜隐球形病毒(apple latent spherical virus, ALSV)、甜菜坏死黄脉病毒(beet necrotic yellow vein virus, BNYYV)、大麦条纹花叶病毒(barley stripe mosaic virus, BSMV)、番茄花叶病毒(tomato mosaic virus, ToMV)、马铃薯X病毒(potato virus X, PVX)和狗尾草花叶病毒(foxtail mosaic virus, FoMV)等。

烟草脆裂病毒(TRV)是最早用于病毒介导的基因组编辑的正链RNA病毒。Ali等(2015a, 2015b)利用改造后的TRV载体将PCNA和PDS基因的sgRNA递送至稳定表达SpCas9基因的烟草中,在侵染植株的后代中检测到可遗传的编辑类型,效率为1/438。后续研究利用TRV介导的基因组编辑技术,在拟南芥中也实现了基因定点编辑(Ali et al., 2018; Luo et al., 2021; Nagalakshmi et al., 2022)。为提高编辑植株的可遗传效率,Ellison等(2020)将拟南芥FT (*FLOWERING LOCUS T*)基因的mRNA、甲硫氨酸tRNA (tRNA^{Met})、甘氨酸tRNA (tRNA^{Gly})及异亮氨酸tRNA (tRNA^{Ile})分

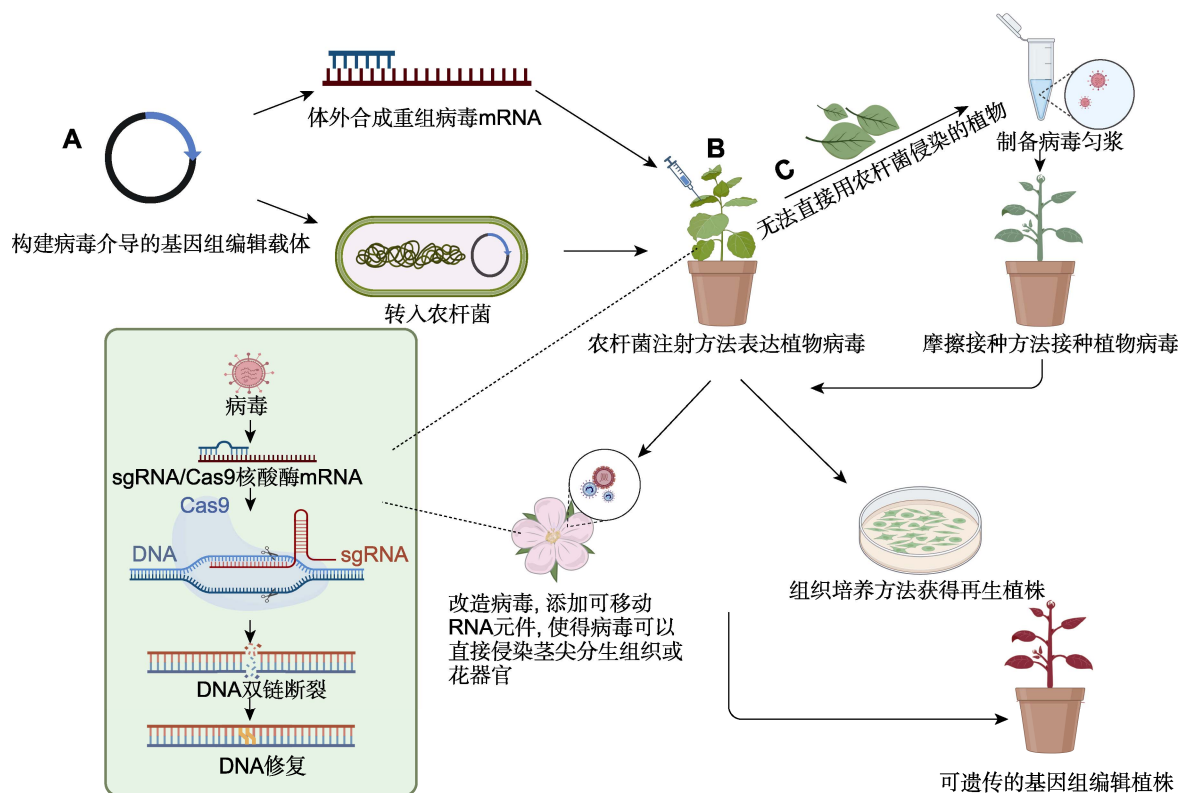


图1 病毒介导的植物基因组编辑技术流程图

(A) 获得可实现基因组编辑的病毒载体; (B) 农杆菌注射法表达植物病毒途径; (C) 无法直接用农杆菌侵染的植物表达病毒途径

Figure 1 Flow chart of virus-mediated genome editing in plants

(A) Engineering of viral vectors for transient expression of genome editing reagent; (B) Pathway of using *Agrobacterium* inoculation method to express plant virus for genome editing; (C) Pathway of delivery of virus to plants which cannot be infected by *Agrobacterium* inoculation

别与sgRNA融合,使烟草后代的可遗传编辑效率达65%–100%。同样, Nagalakshmi等(2022)研究发现,将sgRNA与可移动元件融合后的编辑系统在拟南芥中可实现多基因同时编辑,并能获得较高且可稳定遗传的编辑效率。

烟草花叶病毒(TMV)是烟草花叶病毒属中首个被发现的正链RNA病毒(Creager et al., 1999),具有杆状外观, TMV基因组由6.3–6.5 kb单链(ss) RNA组成。有专家利用TMV作为sgRNA的表达载体,在稳定表达SpCas9转基因烟草中实现了GFP及NbAGO1基因敲除。此外,该研究还证明, RNA病毒载体可通过植株再生或者有性繁殖方法去除(Cody et al., 2017)。另外, Chiong等(2021)研究表明,当基因沉默抑制物(如TMV 126 kDa复制酶或番茄矮壮病毒P19蛋白)存在时,可抑制植物体内的基因沉默进而提高Cas9蛋白的表达量,该方法为提高病毒介导的基因组编辑效率

提供了一种可行的方案。

豌豆早枯病毒(PEBV)以及苹果潜隐球形病毒(ALSV)均是由2个正义单链RNA分子组成的植物病毒,经改造后分别在拟南芥、烟草以及大豆(*Glycine max*)中实现了较高效率的基因组编辑(Ali et al., 2018; Luo et al., 2021)。甜菜坏死黄脉病毒(BNYVV)基因组由5条正义单链RNA组成,是甜菜丛根病的病原物。经改造的BNYVV载体可在烟草和甜菜(*Beta vulgaris*)等植物的同一细胞中高效表达4个重组蛋白(包括一些长度达880 aa的大分子量蛋白)。因此, BNYVV载体在多个蛋白和较大蛋白表达方面优于其它载体。利用可表达烟草NbPDS基因的sgRNA重组BNYVV, 侵染稳定表达SpCas9基因的转基因烟草后表现出白化表型,与目前基于病毒的sgRNA其它传递系统相比, BNYVV载体系统对NbPDS3的编辑效率最高(达85%) (Jiang et al., 2019)。

表1 病毒介导的植物CRISPR/Cas基因组编辑技术

Table 1 Virus-mediated CRISPR/Cas genome editing technology in plants

病毒类型	病毒名称	受体植物	递送成分	非组织培养稳定遗传效率	参考文献
正链RNA病毒	烟草脆裂病毒	本氏烟草(<i>Nicotiana benthamiana</i>) (Cas9过表达)	sgRNAs	0.2%	Ali et al., 2015a
	烟草脆裂病毒和豌豆早枯病毒	本氏烟草和拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>) (Cas9过表达)	sgRNAs	N.A	Ali et al., 2015b, 2018
	烟草脆裂病毒	本氏烟草(Cas9过表达)	sgRNAs和可移动sgRNAs	65%–100%	Ellison et al., 2020
	烟草脆裂病毒	拟南芥(过表达SunTag系统)	sgRNAs和可移动sgRNAs	5%–8%	Ghoshal et al., 2020
	烟草脆裂病毒	拟南芥(Cas9过表达)	sgRNAs和可移动sgRNAs	39%–60%	Nagalakshmi et al., 2022
	烟草脆裂病毒	烟草(<i>N. tabacum</i>) (Cas9过表达)	sgRNAs	N.A	Oh et al., 2022
	烟草脆裂病毒和豌豆早枯病毒	烟草(Cas9过表达)	sgRNAs	N.A	Kim et al., 2023
	烟草花叶病毒	本氏烟草(Cas9过表达)	Cas9和sgRNAs	N.A	Cody et al., 2017
	烟草花叶病毒	本氏烟草	Cas9和sgRNAs	N.A	Chiong et al., 2021
	番茄花叶病毒	本氏烟草(分开的SaCas9s部分过表达)	部分Split-SaCas9s和sgRNAs	N.A	Kaya et al., 2017
	苹果潜隐球形病毒	本氏烟草和大豆(<i>Glycine max</i>) (Cas9, Csy4过表达)	sgRNAs	N.A	Luo et al., 2021
	甜菜坏死黄脉病毒	本氏烟草(Cas9过表达)	sgRNAs	N.A	Jiang et al., 2019
	大麦条纹花叶病毒	本氏烟草、小麦(<i>Triticum aestivum</i>)和玉米(<i>Zea mays</i>) (Cas9过表达)	sgRNAs	N.A	Hu et al., 2019
	大麦条纹花叶病毒	小麦(Cas9过表达)	sgRNAs和可移动sgRNAs	0–17%	Wang et al., 2022
	大麦条纹花叶病毒	本氏烟草和小麦(Cas9过表达)	sgRNAs和可移动sgRNAs	12.9%–100%	Li et al., 2021
	大麦条纹花叶病毒	本氏烟草和小麦(Cas9过表达)	sgRNAs和可移动sgRNAs	0.5%–0.8%	Chen et al., 2022
	大麦条纹花叶病毒	本氏烟草和大麦(<i>Hordeum vulgare</i>) (Cas9过表达)	sgRNAs	100%	Tamilselvan-Nattar-Amutha et al., 2023
	马铃薯X病毒	本氏烟草	Cas9和sgRNAs	N.A	Ariga et al., 2020
	马铃薯X病毒	本氏烟草(Cas9过表达)	sgRNAs和可移动sgRNAs	22%	Uranga et al., 2021
	狗尾草花叶病毒	本氏烟草	Cas9和sgRNAs	N.A	Zhang et al., 2020
狗尾草花叶病毒	本氏烟草、玉米和狗尾草(<i>Setaria viridis</i>) (Cas9过表达)	sgRNAs	N.A	Mei et al., 2019	
负链RNA病毒	苦苣菜黄网弹状病毒	本氏烟草	Cas9和sgRNAs	N.A	Ma et al., 2020
	大麦黄条纹花叶病毒	本氏烟草	Cas9和sgRNAs	N.A	Gao et al., 2019
	番茄斑萎病毒	本氏烟草、番茄(<i>Solanum lycopersicum</i>)、辣椒(<i>Capsicum annuum</i>)、灯笼果(<i>Physalis peruviana</i>)和花生(<i>Arachis hypogaea</i>)	Cas9和sgRNAs, Cas12a和crRNA	N.A	Liu et al., 2023
DNA病毒	甘蓝曲叶病毒	本氏烟草(Cas9过表达)	sgRNAs	N.A	Yin et al., 2015
	棉皱叶病毒	拟南芥(Cas9过表达)	sgRNAs和可移动sgRNAs	4.35%–8.79%	Lei et al., 2021
	棉皱叶病毒	棉花(<i>Gossypium</i> spp.) (Cas9过表达)	sgRNAs和可移动sgRNAs	N.A	Lei et al., 2022

N.A: 无或未检测到非组织培养方法获得的可遗传编辑后代。本表不含通过农杆菌及基因枪方式导入双生病毒载体。

N.A: None or no heritable edited progeny were obtained by non-tissue culture methods. This table does not include geminivirus vector delivered by *Agrobacterium* or bombardment.

大麦条纹花叶病毒(BSMV)是正义单链RNA病毒,由RNA α 、RNA β 和RNA γ 三部分组成。有研究表明,改造后的BSMV在小麦、大麦(*Hordeum vulgare*)以及短柄草(*Brachypodium sylvaticum*)等单子叶植物中可以有效诱导基因沉默(Purkayastha and Dasgupta, 2009; Senthil-Kumar and Mysore, 2011; Yuan et al., 2011)和基因超表达(Tai et al., 2007; Chapman et al., 2008; Lee et al., 2012)。由于BSMV可侵染主要粮食作物小麦,所以其介导的基因组编辑技术备受关注并取得较大进展(Hu et al., 2019; Li et al., 2021; Chen et al., 2022; Wang et al., 2022; Tamilselvan-Nattar-Amutha et al., 2023)。Li等(2021)利用改造的BSMV系统将sgRNA递送至稳定表达*SpCas9*的转基因小麦中,实现了高效且可遗传的基因组编辑,获得不携带病毒的突变体植株。

Avesani等(2007)研究表明,病毒表达外源基因的大小与植物病毒载体的稳定性呈负相关。目前已有报道的病毒介导的植物基因组编辑多数为利用病毒表达靶标基因的sgRNA,无法表达较大的*Cas9*等核酸酶。有专家将番茄花叶病毒(ToMV)、马铃薯X病毒(PVX)及狗尾草花叶病毒(FoMV)分别用于部分或者完整*Cas9*核酸酶表达,并实现了基因组编辑(Kaya et al., 2017; Mei et al., 2019; Ariga et al., 2020; Zhang et al., 2020; Uranga et al., 2021)。ToMV是烟草花叶病毒属成员,与模式病毒烟草花叶病毒亲缘关系较近。由于ToMV病毒无法表达完整的*SaCas9*蛋白,研究人员将*SaCas9*拆分成两部分,然后分别利用农杆菌和ToMV载体表达拆分的*SaCas9*片段,结果表明该方法可诱导植物细胞发生定向突变,并且可减少脱靶效应,证实了使用植物病毒载体表达Split-*SaCas9*的可行性。另外,该方法具有在时间和空间上调控CRISPR/Cas9介导的植物细胞基因组编辑活性的潜力(Kaya et al., 2017)。马铃薯X病毒(PVX)是由1条正链RNA组成的线性病毒,长约6.4 kb,病毒粒子呈弯曲的长杆状,PVX的丝状柔性结构使基因插入的大小在PVX载体中不受限制。利用PVX载体表达*Cas9*和sgRNA的高效定向突变烟草,在无抗生素筛选情况下,超过60%的再生芽带有靶向突变,而18%的再生芽含有T-DNA(Ariga et al., 2020)。FoMV与马铃薯X病毒的基因组结构和组成十分相似,为单组分正义单链RNA病毒,寄主范围广泛,可感染

包括水稻、小麦和玉米(*Zea mays*)等在内的56种单子叶植物以及至少35种双子叶植物。Zhang等(2020)研究表明,FoMV病毒载体可同时表达*Cas9*、sgRNA和RNAi抑制因子,有效地在烟草中实现了基因组编辑。

2.2 负链RNA病毒介导的CRISPR/Cas基因组编辑技术

相对于DNA和正链RNA病毒,植物负链RNA病毒表达外源基因的能力更强(Jackson et al., 2005; Ganesan et al., 2013; Wang et al., 2015; Ma et al., 2020)。目前,用于病毒介导的CRISPR/Cas9基因组编辑的负链RNA病毒包括苦苣菜黄网弹状病毒(*Sonchus yellow net rhabdovirus*, SYNV)、大麦黄条纹花叶病毒(barley yellow striate mosaic virus, BYSMV)和番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)。Ma等(2020)将CRISPR/Cas9表达框插入弹状病毒载体SYNV中,并在sgRNA序列两侧连接tRNA^{Gly}前体序列,以便利用细胞内源tRNA加工机制对病毒转录的sgRNA末端进行精确剪切。重组病毒接种本氏烟草(*N. benthamiana*)可以有效形成系统侵染并且表达*Cas9*和sgRNA,对转基因*GFP*靶点产生高达90%以上的靶向编辑。另外,该重组病毒载体可通过汁液摩擦传代,并且维持CRISPR/Cas9稳定表达和高效编辑。进一步研究发现,病毒载体递送的CRISPR/Cas9对多个内源基因靶点全部表现出较高的编辑频率(40%–91%)。Liu等(2023)通过改造番茄斑萎病毒(TSWV),在M基因组中插入*Cas12a*和*Cas9*等较大核酸酶基因或含有相应的单碱基编辑元件(ABE或CBE),在S基因组中插入sgRNA序列代替非必需病毒基因,克服了病毒编码限制,使TSWV能通过植物系统传递整个CRISPR/Cas组件,并实现基因组编辑。然而,目前负链RNA病毒在单子叶植物中的应用还有技术限制。例如,多数单子叶植物感染负链RNA弹状病毒只能通过相应的昆虫介导,不能利用机械摩擦等方式接种(Gao et al., 2019)。

2.3 DNA病毒介导的CRISPR/Cas基因组编辑技术

植物DNA病毒中双链DNA病毒比较少见,主要为花椰菜花叶病毒科病毒。目前开发应用的双链DNA病毒有甘蓝曲叶病毒(cabbage leaf curl virus, CaLCuV)。CaLCuV载体表达miRNA诱发的靶基因沉默具有更

高的沉默效率。稳定表达*SpCas9*基因的转基因烟草,在侵染可表达*NbPDS3*和*NblspH*基因sgRNA的重组CaLCuV后,新叶表现出白化表型(Yin et al., 2015)。

单链DNA病毒以双生病毒科病毒的研究最为广泛。双生病毒是一类在世界范围内广泛流行的植物单链DNA病毒,对全球作物造成毁灭性危害。目前,用于基因组编辑的双生DNA病毒载体包括棉皱叶病毒(cotton leaf crumple virus, CLCrV)、菜豆黄矮病毒(bean yellow dwarf viurs, BeYDV)和小麦矮缩病毒(wheat dwarf virus, WDV)。CLCrV是一种双组分DNA病毒,含有CLCrV-A和CLCrV-B两个基因组。Lei等(2021)利用CLCrV介导的VIGE系统有效实现了拟南芥内源基因的靶向编辑,将sgRNAs的5'端与FT mRNA融合方法获得了可遗传突变,效率为4.35%–8.79%;并且通过FT-sgRNAs进行基因编辑的后代不包含CLCrV基因组的任何成分。利用CLCrV递送sgRNA的策略可以有效编辑棉花(*Gossypium hirsutum*)基因,并可同时递送多个sgRNA,实现多基因编辑,但是很难检测到可遗传的突变体后代(Lei et al., 2022)。

基于双生病毒的复制子能实现高效的基因组工程。与DNA病毒复制子相比, RNA病毒载体的优势在于完全避免了与植物基因组的整合,并能产生无外源DNA的植物,从而规避了额外的安全问题。

3 结语与展望

传统的植物基因组编辑在一定程度上依赖高效的转化系统,目前常用的转化系统包括农杆菌介导法和基因枪轰击法等。然而,这两种方法有宿主范围限制,仅适用于部分植物物种和组织,故仅在一些物种中建立,组织培养再生困难的植物仍然无法应用(Lin et al., 2018; Cao et al., 2022)。理论上讲,病毒介导的CRISPR/Cas基因组编辑技术可突破物种限制,但受限于病毒表达蛋白的能力,多数情况下外源基因插入的长度与植物病毒载体的稳定性呈负相关(Avesani et al., 2007)。目前所报道的研究中虽然有烟草花叶病毒、马铃薯X病毒、狗尾草花叶病毒、苦苣菜黄网弹状病毒、大麦黄条纹花叶病毒和番茄斑萎病毒可用于表达完整的Cas9,但由于载体的改造或较大核酸蛋白的插入导致病毒的稳定性及传播能力改变,使病毒

侵染后无法引起植物系统性感染。在接种病毒的植株新叶或茎尖分生组织等中检测不到病毒的存在和基因组编辑,只能通过对感染病毒的叶片进行组织培养和再生等过程获得基因组编辑植株。针对受病毒表达外源蛋白能力限制这一科学问题,专家们进行了不断尝试。例如,将Cas9蛋白分裂成2个或多个非活性蛋白片段,并利用病毒在植物细胞内进行表达,这些片段可在体内重新组装成具有核酸酶活性的蛋白。Kaya等(2017)将SaCas9截断成两部分,结果表明2种类型的截断SaCas9 (_430N/431C和_739N/740C)均表现出基因组编辑活性,并且split-SaCas9_739N/740C的活性与全长SaCas9的活性几乎相同。利用烟草花叶病毒和农杆菌分别表达Split-SaCas9两部分,在烟草中实现了基因组编辑,证实了在植物中采用该方法的可行性。

另一种有效的方法是,将具有基因组编辑能力且分子量较小的核酸酶(大小仅为400–800 aa)应用于病毒介导的基因组编辑技术,如CasΦ (Pausch et al., 2020)、AsCas12f1 (Wu et al., 2021)、Un1Cas12f1 (Kim et al., 2022)、SpCas12f1 (Bigelyte et al., 2021)和Cas λ (Al-Shayeb et al., 2022)。之前的报道均证明, CasΦ、SpCas12f1和Casλ可在植物中实现基因组编辑,编辑效率分别为0.85%、14%–59%和18%。最新的两项研究显示,利用CRISPR/CasΦ在水稻和拟南芥中实现了基因组编辑(Cai et al., 2022; Liu et al., 2022; Li et al., 2023)。可见,这些新型核酸酶在病毒介导的植物基因组编辑领域的应用具有一定的可行性(Arigo et al., 2020; Pausch et al., 2020)。

对于植物基因组编辑而言,为获得稳定的遗传性状,首先须保证编辑植株的突变位点可稳定遗传到下一代。然而,目前报道的植物病毒介导的基因组编辑技术中,获得可遗传的基因组编辑方法还主要通过感病植株的组织或器官的组织培养及再生过程,故仍受到物种及基因型限制,对尚未建立组织培养及再生体系的植株无法应用。病毒介导的植物基因组编辑后代遗传效率较低的主要原因是多数病毒无法进入茎尖分生组织或花器官等。现有报道中,仅大麦条纹花叶病毒(BSMV)被证明可高效侵染植物的种子和发育器官,并可将突变稳定遗传到下一代。针对该问题,专家们提出了不同的解决方案。例如, Ellison等(2020)在稳定表达*SpCas9*的转基因烟草中,通过病毒感染

方法表达sgRNA, 与建立组织培养和再生体系不同的是, 该sgRNA的3'末端融合了*FT* (*Flowering Locus T*)编码序列, 融合后的sgRNA能被*FT* RNA引导至茎顶端分生组织并对茎尖分生组织细胞进行编辑, 通过该方法获得的后代植株编辑效率达65%–100%, 同时感染表达3种sgRNA的病毒子代中, 3个靶向位点同时突变的频率高达30%。Lei等(2021)将sgRNAs与*FT*部分序列融合后重组到棉花皱缩病毒, 发现稳定表达SpCas9蛋白的拟南芥在感染重组的病毒后, 可实现基因组编辑并且获得可遗传的后代, 效率为4.35%–8.79%。因此, 利用RNA病毒和可移动RNA基因组编辑系统能获得稳定遗传的编辑材料, 且无须经过组织培养和再生等过程, 极大加速了育种进程(Ellison et al., 2020)。

有研究表明, 部分植物病毒可通过种子等传播至下一代, 对植物产量等造成影响。因此, 病毒介导的植物基因组编辑技术另一个需要解决的问题是基因组编辑后代植株的脱毒处理。有文献报道, 通过自交或杂交方法即可从基因组编辑后代中筛选获得无毒的基因组编辑株系(Li et al., 2021; Tamilselvan-Nattar-Amutha et al., 2023)。例如, Li等(2021)通过自交或者与野生型植株杂交方法, 从BSMV介导的基因组编辑后代中筛选到53.8%–100%不带毒株系。Tamilselvan-Nattar-Amutha等(2023)报道的BSMV介导的大麦基因组编辑研究中, 通过自交方法获得的38个植株内有14株不带病毒。另外, 通过组织培养方法获得的可遗传的编辑植株, 可通过在培养基中添加化学药物进行脱毒处理。例如, Liu等(2023)研究发现, 核苷酸类似物利巴韦林可以使再生植株100%脱除病毒。此外, 植物种子常用的(物理、化学和生物等)脱毒方法在病毒介导的植物基因组编辑技术中应用的可行性也值得探索。

基于CRISPR/Cas的基因组编辑技术在植物科学领域产生了深远的影响。目前, 许多植物病毒已应用于CRISPR/Cas成分的递送且实现了基因定点编辑。尽管还存在一些技术瓶颈, 但我们相信所有瓶颈终将会被突破, 病毒介导的基因组编辑技术有望应用于创制优良的作物新品种, 为全球粮食安全做出贡献。

作者贡献声明

胡丹玲: 文章初稿撰写; 孙永伟: 文章结构设计, 论

文修改。

参考文献

- Ali Z, Abul-Faraj A, Li LX, Ghosh N, Piatek M, Mahjoub A, Aouida M, Piatek A, Baltes NJ, Voytas DF, Dinesh-Kumar S, Mahfouz MM (2015a). Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant* **8**, 1288–1291.
- Ali Z, Abul-Faraj A, Piatek M, Mahfouz MM (2015b). Activity and specificity of TRV-mediated gene editing in plants. *Plant Signal Behav* **10**, e1044191.
- Ali Z, Eid A, Ali S, Mahfouz MM (2018). *Pea early-browning virus*-mediated genome editing via the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Virus Res* **244**, 333–337.
- Al-Shayeb B, Skopintsev P, Soczek KM, Stahl EC, Li Z, Groover E, Smock D, Eggers AR, Pausch P, Cress BF, Huang CJ, Staskawicz B, Savage DF, Jacobsen SE, Banfield JF, Doudna JA (2022). Diverse virus-encoded CRISPR-Cas systems include streamlined genome editors. *Cell* **185**, 4574–4586.
- Ariga H, Toki S, Ishibashi K (2020). Potato virus X vector-mediated DNA-free genome editing in plants. *Plant Cell Physiol* **61**, 1946–1953.
- Avesani L, Marconi G, Morandini F, Albertini E, Bruschetta M, Bortesi L, Pezzotti M, Porceddu A (2007). Stability of *Potato virus X* expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic Res* **16**, 587–597.
- Barrangou R (2014). Cas9 targeting and the CRISPR revolution. *Science* **344**, 707–708.
- Bernabé-Orts JM, Casas-Rodrigo I, Minguet EG, Landolfi V, García-Carpintero V, Gianoglio S, Vázquez-Vilar M, Granell A, Orzaez D (2019). Assessment of Cas12a-mediated gene editing efficiency in plants. *Plant Biotechnol J* **17**, 1971–1984.
- Bigelyte G, Young JK, Karvelis T, Budre K, Zedaveinyte R, Djukanovic V, Van Ginkel E, Paulraj S, Gasior S, Jones S, Feigenbutz L, Clair GS, Barone P, Bohn J, Acharya A, Zastrow-Hayes G, Henkel-Heinecke S, Silanskas A, Seidel R, Siksnys V (2021). Miniature type V-F CRISPR-Cas nucleases enable targeted DNA modification in cells. *Nat Commun* **12**, 6191.
- Cai QN, Guo DM, Cao YJ, Li Y, Ma R, Liu WP (2022). Application of CRISPR/CasΦ2 system for genome editing in plants. *Int J Mol Sci* **23**, 5755.
- Cao XS, Xie HT, Song ML, Lu JH, Ma P, Huang BY, Wang

- MG, Tian YF, Chen F, Peng J, Lang ZB, Li GF, Zhu JK** (2022). Cut-dip-budding delivery system enables genetic modifications in plants without tissue culture. *Innovation (Camb)* **4**, 100345.
- Chapman S, Faulkner C, Kaiserli E, Garcia-Mata C, Savenkov EI, Roberts AG, Oparka KJ, Christie JM** (2008). The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 20038–20043.
- Chen H, Su ZQ, Tian B, Liu Y, Pang YH, Kavetskiy V, Trick HN, Bai GH** (2022). Development and optimization of a *Barley stripe mosaic virus*-mediated gene editing system to improve *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Plant Biotechnol J* **20**, 1018–1020.
- Chen KL, Wang YP, Zhang R, Zhang HW, Gao CX** (2019). CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu Rev Plant Biol* **70**, 667–697.
- Chiong KT, Cody WB, Scholthof HB** (2021). RNA silencing suppressor-influenced performance of a virus vector delivering both guide RNA and Cas9 for CRISPR gene editing. *Sci Rep* **11**, 6769.
- Cody WB, Scholthof HB, Mirkov TE** (2017). Multiplexed gene editing and protein overexpression using a *Tobacco mosaic virus* viral vector. *Plant Physiol* **175**, 23–35.
- Creager ANH, Scholthof KBG, Citovsky V, Scholthof HB** (1999). Tobacco mosaic virus: pioneering research for a century. *Plant Cell* **11**, 301–308.
- Ellison EE, Nagalakshmi U, Gamo ME, Huang PJ, Dinesh-Kumar S, Voytas DF** (2020). Multiplexed heritable gene editing using RNA viruses and mobile single guide RNAs. *Nat Plants* **6**, 620–624.
- Ganesan U, Bragg JN, Deng M, Marr S, Lee MY, Qian SS, Shi ML, Kappel J, Peters C, Lee Y, Goodin MM, Dietzgen RG, Li ZH, Jackson AO** (2013). Construction of a *Sonchus yellow net virus* minireplicon: a step toward reverse genetic analysis of plant negative-strand RNA viruses. *J Virol* **87**, 10598–10611.
- Gao CX** (2018). The future of CRISPR technologies in agriculture. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 275–276.
- Gao Q, Xu WY, Yan T, Fang XD, Cao Q, Zhang ZJ, Ding ZH, Wang Y, Wang XB** (2019). Rescue of a plant cytorhabdo virus as versatile expression platforms for planthopper and cereal genomic studies. *New Phytol* **223**, 2120–2133.
- Ghoshal B, Vong B, Picard CL, Feng SH, Tam JM, Jacobsen SE** (2020). A viral guide RNA delivery system for CRISPR-based transcriptional activation and heritable targeted DNA demethylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **16**, e1008983.
- He XL, Liu PC, Ma BJ, Chen XF** (2022). Advance in gene editing technology based on CRISPR/Cas9 and its application in plants. *Chin Bull Bot* **57**, 508–531. (in Chinese)
- 何晓玲, 刘鹏程, 马伯军, 陈析丰 (2022). 基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑技术研究进展及其在植物中的应用. *植物学报* **57**, 508–531.
- He YB, Zhang T, Sun H, Zhan HD, Zhao YD** (2020). A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation. *Hortic Res* **7**, 152.
- Hu JC, Li SY, Li ZL, Li HY, Song WB, Zhao HM, Lai JS, Xia LQ, Li DW, Zhang YL** (2019). A barley stripe mosaic virus-based guide RNA delivery system for targeted mutagenesis in wheat and maize. *Mol Plant Pathol* **20**, 1463–1474.
- Jackson AO, Dietzgen RG, Goodin MM, Bragg JN, Deng M** (2005). Biology of plant rhabdoviruses. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 623–660.
- Jiang N, Zhang C, Liu JY, Guo ZH, Zhang ZY, Han CG, Wang Y** (2019). Development of *Beet necrotic yellow vein virus*-based vectors for multiple-gene expression and guide RNA delivery in plant genome editing. *Plant Biotechnol J* **17**, 1302–1315.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E** (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821.
- Kaya H, Ishibashi K, Toki S** (2017). A split *Staphylococcus aureus* Cas9 as a compact genome-editing tool in plants. *Plant Cell Physiol* **58**, 643–649.
- Kim DY, Lee JM, Moon SB, Chin HJ, Park S, Lim Y, Kim D, Koo T, Ko JH, Kim YS** (2022). Efficient CRISPR editing with a hypercompact Cas12f1 and engineered guide RNAs delivered by adeno-associated virus. *Nat Biotechnol* **40**, 94–102.
- Kim H, Oh Y, Park E, Kang M, Choi Y, Kim SG** (2023). Heritable virus-induced genome editing (VIGE) in *Nicotiana attenuata*. In: Bae S, Song B, eds. *Base Editors: Methods and Protocols*. New York: Humana. pp. 203–218.
- Lee WS, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K** (2012). *Barley stripe mosaic virus*-mediated tools for investigating gene function in cereal plants and their pathogens: virus-induced gene silencing, host-mediated gene silencing, and virus-mediated overexpression of heterologous protein. *Plant Physiol* **160**, 582–590.
- Lei JF, Dai PH, Li Y, Zhang WQ, Zhou GT, Liu C, Liu XD**

- (2021). Heritable gene editing using *FT* mobile guide RNAs and DNA viruses. *Plant Methods* **17**, 20.
- Lei JF, Li Y, Dai PH, Liu C, Zhao Y, You YZ, Qu YY, Chen QJ, Liu XD** (2022). Efficient virus-mediated genome editing in cotton using the CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci* **13**, 1032799.
- Li SY, Li JY, He YB, Xu ML, Zhang JH, Du WM, Zhao YD, Xia LQ** (2019). Precise gene replacement in rice by RNA transcript-templated homologous recombination. *Nat Biotechnol* **37**, 445–450.
- Li SY, Xia LQ** (2020). Precise gene replacement in plants through CRISPR/Cas genome editing technology: current status and future perspectives. *aBIOTECH* **1**, 58–73.
- Li TD, Hu JC, Sun Y, Li BS, Zhang DL, Li WL, Liu JX, Li DW, Gao CX, Zhang YL, Wang YP** (2021). Highly efficient heritable genome editing in wheat using an RNA virus and bypassing tissue culture. *Mol Plant* **14**, 1787–1798.
- Li Z, Zhong ZH, Wu ZS, Pausch P, Al-Shayeb B, Amerasekera J, Doudna JA, Jacobsen SE** (2023). Genome editing in plants using the compact editor casΦ. *Proc Natl Acad Sci USA* **120**, e2216822120.
- Liang Z, Chen KL, Li TD, Zhang Y, Wang YP, Zhao Q, Liu JX, Zhang HW, Liu CM, Ran YD, Gao CX** (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* **8**, 14261.
- Lin CS, Hsu CT, Yang LH, Lee LY, Fu JY, Cheng QW, Wu FH, Hsiao HCW, Zhang YS, Zhang R, Chang WJ, Yu CT, Wang W, Liao LJ, Gelvin SB, Shih MC** (2018). Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnol J* **16**, 1295–1310.
- Liu HW, Zhang BH** (2020). Virus-based CRISPR/Cas9 genome editing in plants. *Trends Genet* **36**, 810–813.
- Liu Q, Zhao CL, Sun K, Deng YL, Li ZH** (2023). Engineered biocontainable RNA virus vectors for non-transgenic genome editing across crop species and genotypes. *Mol Plant* **16**, 616–631.
- Liu SS, Sretenovic S, Fan TT, Cheng YH, Li G, Qi A, Tang X, Xu Y, Guo WJ, Zhong ZH, He Y, Liang YL, Han QQ, Zheng XL, Gu XF, Qi YP, Zhang Y** (2022). Hypercompact CRISPR-Cas12j2 (CasΦ) enables genome editing, gene activation, and epigenome editing in plants. *Plant Commun* **3**, 100453.
- Liu YG, Li GS, Zhang YL, Chen LT** (2019). Current advances on CRISPR/Cas genome editing technologies in plants. *J South China Agricul Univ* **40**(5), 38–49. (in Chinese)
- 刘耀光, 李构思, 张雅玲, 陈乐天** (2019). CRISPR/Cas植物基因组编辑技术研究进展. 华南农业大学学报 **40**(5), 38–49.
- Luo YJ, Na R, Nowak JS, Qiu Y, Lu QS, Yang CY, Marsolais F, Tian LN** (2021). Development of a Csy4-processed guide RNA delivery system with soybean-infecting virus ALSV for genome editing. *BMC Plant Biol* **21**, 419.
- Ma XN, Zhang XY, Liu HM, Li ZH** (2020). Highly efficient DNA-free plant genome editing using virally delivered CRISPR-Cas9. *Nat Plants* **6**, 773–779.
- Mei Y, Beernink BM, Ellison EE, Konečná E, Neelakandan AK, Voytas DF, Whitham SA** (2019). Protein expression and gene editing in monocots using foxtail mosaic virus vectors. *Plant Direct* **3**, e00181.
- Nagalakshmi U, Meier N, Liu JY, Voytas DF, Dinesh-Kumar SP** (2022). High-efficiency multiplex biallelic heritable editing in *Arabidopsis* using an RNA virus. *Plant Physiol* **189**, 1241–1245.
- Oh Y, Kim H, Lee HJ, Kim SG** (2022). Ribozyme-processed guide RNA enhances virus-mediated plant genome editing. *Biotechnol J* **17**, 2100189.
- Pausch P, Al-Shayeb B, Bisom-Rapp E, Tsuchida CA, Li Z, Cress BF, Knott GJ, Jacobsen SE, Banfield JF, Doudna JA** (2020). CRISPR-CasΦ from huge phages is a hypercompact genome editor. *Science* **369**, 333–337.
- Purkayastha A, Dasgupta I** (2009). Virus-induced gene silencing: a versatile tool for discovery of gene functions in plants. *Plant Physiol Biochem* **47**, 967–976.
- Senthil-Kumar M, Mysore KS** (2011). New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends Plant Sci* **16**, 656–665.
- Su YK, Qiu JR, Zhang H, Song ZQ, Wang JH** (2019). Recent progress in evolutionary technology of CRISPR/Cas9 system for plant genome editing. *Chin Bull Bot* **54**, 385–395. (in Chinese)
- 苏钺凯, 邱镜仁, 张晗, 宋振巧, 王建华** (2019). CRISPR/Cas9系统在植物基因组编辑中技术改进与创新的研究进展. 植物学报 **54**, 385–395.
- Tai YS, Bragg J, Meinhardt SW** (2007). Functional characterization of toxa and molecular identification of its intracellular targeting protein in wheat. *Am J Plant Physiol* **2**, 76–89.
- Tamilselvan-Nattar-Amutha S, Hiekel S, Hartmann F, Lorenz J, Dabhi RV, Dreissig S, Hensel G, Kumlehn J, Heckmann S** (2023). Barley stripe mosaic virus-mediated somatic and heritable gene editing in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Front Plant Sci* **14**, 1201446.

- Uranga M, Aragonés V, Selma S, Vázquez-Vilar M, Orzáez D, Daròs JA** (2021). Efficient Cas9 multiplex editing using unspaced sgRNA arrays engineering in a *Potato virus X* vector. *Plant J* **106**, 555–565.
- Wang D, Tai PWL, Gao GP** (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 358–378.
- Wang Q, Ma XN, Qian SS, Zhou X, Sun K, Chen XL, Zhou XP, Jackson AO, Li ZH** (2015). Rescue of a plant negative-strand RNA virus from cloned cDNA: insights into enveloped plant virus movement and morphogenesis. *PLoS Pathog* **11**, e1005223.
- Wang W, Yu ZT, He F, Bai GH, Trick HN, Akhunova A, Akhunov E** (2022). Multiplexed promoter and gene editing in wheat using a virus-based guide RNA delivery system. *Plant Biotechnol J* **20**, 2332–2341.
- Wu ZW, Zhang YF, Yu HP, Pan D, Wang YJ, Wang YN, Li F, Liu C, Nan H, Chen WZ, Ji QJ** (2021). Programmed genome editing by a miniature CRISPR-Cas12f nuclease. *Nat Chem Biol* **17**, 1132–1138.
- Yin KQ, Han T, Liu G, Chen TY, Wang Y, Yu AYL, Liu YL** (2015). A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci Rep* **5**, 14926.
- Yip BH** (2020). Recent advances in CRISPR/Cas9 delivery strategies. *Biomolecules* **10**, 839.
- Yuan C, Li C, Yan LJ, Jackson AO, Liu ZY, Han CG, Yu JL, Li DW** (2011). A high throughput *Barley stripe mosaic virus* vector for virus induced gene silencing in monocots and dicots. *PLoS One* **6**, e26468.
- Zhan XQ, Lu YM, Zhu JK, Botella JR** (2021). Genome editing for plant research and crop improvement. *J Integr Plant Biol* **63**, 3–33.
- Zhang X, Kang LH, Zhang Q, Meng QQ, Pan YF, Yu ZM, Shi NN, Jackson S, Zhang XL, Wang HZ, Tor M, Hong YG** (2020). An RNAi suppressor activates in planta virus-mediated gene editing. *Funct Integr Genomics* **20**, 471–477.

Advances in Virus-mediated Genome Editing Technology in Plants

Danling Hu, Yongwei Sun*

School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010000, China

Abstract As a new technology for targeted genome editing, clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) and CRISPR-associated protein (Cas) have the advantages of easy operation, high editing efficiency, and support for multi-target editing, thus showing wide application prospects in plant genetic breeding. However, the process in plants relies mainly on *Agrobacterium*- or particle bombardment-mediated genetic transformation, which is time-consuming as well as species- and varieties-dependent. Virus-mediated plant genome editing has attracted extensive attention because of its no requirement of genetic transformation and plant regeneration. In this review, we introduce the working principle and advantages of virus-mediated CRISPR/Cas plant genome editing technology, systematically summarize the current application status of this technology in the field of plant genome editing, and focus on discussing the problems and challenges of this technology system, aiming to provide reference for further research and development in this field.

Key words virus, plant, genome editing, CRISPR/Cas

Hu DL, Sun YW (2024). Advances in virus-mediated genome editing technology in plants. *Chin Bull Bot* **59**, 452–462.

* Author for correspondence. E-mail: sunyongwei@imu.edu.cn

(责任编辑: 孙冬花)

通讯作者简介

孙永伟, 内蒙古大学生命科学学院副教授、硕士生导师。入选内蒙古自治区高等学校青年科技英才计划。先后主持国家自然科学基金项目3项, 内蒙古自然科学基金面上项目3项。主要从事牧草生物学及牧草基因组编辑体系建立相关研究。在 *Molecular Plant*、*Plant Biotechnology Journal* 和 *Frontiers in Plants Science* 等期刊发表学术论文10余篇, 授权国家发明专利10余项。