

植物病毒介导基因编辑的研究进展

王献兵*, 杨一舟, 乔继辉

中国农业大学生物学院, 植物抗逆高效全国重点实验室, 北京 100193

* 联系人, E-mail: wangxianbing@cau.edu.cn

2025-02-20 收稿, 2025-03-21 修回, 2025-04-14 接受, 2025-04-14 网络版发表

国家自然科学基金(32425046, 32370154)和拼多多-中国农业大学研究基金(PC2023b01008)资助

摘要 精准突变植物基因, 定向改良植物性状, 培育高产、优质、抗逆性强的农作物优良品种, 是保障粮食安全的关键所在。基于CRISPR/Cas的基因编辑技术能够精确地改造植物基因组, 开启了农作物精准育种的新时代。传统的植物基因编辑元件递送主要依赖于农杆菌转化等技术, 然而在一些重要农作物上仍存在转化困难、再生效率低和基因型依赖等瓶颈问题。近年来, 基于植物病毒的表达载体广泛用于外源基因的表达、基因沉默和基因编辑等过程。与传统的基因编辑方法相比, 有些病毒诱导的基因编辑(virus-induced gene editing, VIGE)系统不依赖遗传转化繁琐过程, 仅通过将基因编辑元件插入到植物病毒载体上, 利用病毒高效的侵染和表达能力, 能够快速将编辑元件瞬时递送至植物细胞内完成基因编辑。VIGE技术的应用, 大大缩短了育种周期, 提高了育种效率, 同时避免了外源DNA整合和转基因生物安全风险, 为植物基因编辑提供重要递送工具。本文针对不同类型的VIGE载体进行综述, 探讨VIGE面临的挑战和发展方向, 为VIGE的广泛应用提供参考。

关键词 基因编辑, 植物病毒载体, 递送工具, CRISPR/Cas, 精准育种

面对不断增长的世界人口数量和日益恶劣的自然环境, 培育抗逆高效优质的农作物新品种, 对保障世界粮食安全和农业可持续性发展至关重要。基于成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR相关核酸酶(Cas)系统的基因编辑技术, 是近年来生命科学领域最具革命性的突破之一^[1,2], 为植物基因组精准突变提供了高效的遗传工具。基因编辑过程中, 人工设计的gRNAs(guide RNAs)能够引导Cas蛋白识别并切割特定的DNA靶标序列, 引发细胞的DNA修复过程, 从而实现基因敲除、插入或替换等定点突变^[1,2]。CRISPR/Cas系统已被广泛应用于植物基因功能研究、作物基因改良和生物技术等各个领域^[3-6]。

1 植物基因编辑元件的递送

基因编辑过程中, 如何将CRISPR-Cas元件高效递送到植物细胞中是最关键的一步^[7]。植物中常用的基

因编辑元件递送主要依赖于农杆菌介导的转基因以及基因枪轰击等方法。例如, 将表达gRNA及Cas基因的质粒, 通过农杆菌浸润或是基因枪轰击的方式转入到植物愈伤组织中, 然后诱导再生; 通过抗性标记筛选转基因阳性植株; 再通过分子检测, 在阳性植株中鉴定编辑植株; 最后利用杂交和自交的方式将转入的基因编辑元件去除, 最终获得无外源DNA成分的编辑植株^[3,7]。然而, 传统的稳定遗传转化的方式费时费力, 在一些禾本科农作物上具有很强的基因型依赖, 仅能在少数几个模式品种中进行农杆菌转化和再生, 在大多数普通栽培品种效率很低。例如小麦品种Fielder遗传转化效率能达到50%~90%, 然而在一些商业化的中国普通小麦品种的转化效率仅有2.9%~22.7%, 甚至一些品种例如小麦矮抗58非常难以转化^[8], 这些困难限制了基因编辑在植物育种中的应用。

为了解决上述的瓶颈问题, 科学家们近年来陆续

引用格式: 王献兵, 杨一舟, 乔继辉. 植物病毒介导基因编辑的研究进展. 科学通报, 2025, 70: 4232–4240

Wang X, Yang Y, Qiao J. Advances in plant virus-induced gene editing in plants (in Chinese). Chin Sci Bull, 2025, 70: 4232–4240, doi: 10.1360/TB-2025-0177

研发出一些新的递送方式。例如利用粒子轰击的方式将预先处理好的RNA及Cas蛋白酶复合体直接轰击到植物愈伤组织中,然后通过组培再生直接获得无外源基因成分的T0代编辑植物^[9,10]。这种方法虽然避免了转基因过程,仍依赖植物组织培养,对于一些难以组培再生的非模式品种仍存在一定的难度。后续研究中,科学家加入一些发育调节因子例如WOX5,可以提高植物再生效率^[11,12]。在过表达Cas9的转基因植物中,利用农杆菌瞬时gRNA诱导编辑,同时表达一些发育调控因子,例如*Wuschel 2*(*Wus2*), *SHOOT MERISTEMLESS*(*STM*)和*MONOPTEROS*(*MP*)诱导分生组织,再进行离体培养获得编辑子代植株^[13]。此外,还可利用RNA移动元件长距离移动的特点,将砧木中的转基因编辑元件远距离运输到嫁接组织上进行基因编辑^[14]。尽管这些基因编辑技术取得了显著进展,在一些重要农作物上仍存在费时费力、效率低的特点,仍亟需更高效的基因递送方式和编辑策略。

2 植物病毒载体的递送编辑元件的体系

植物病毒是严格的胞内寄生生物,能够在植物细胞内大量增殖,引起严重的植物病毒病害,威胁粮食生产。近年来,植物病毒学家“变毒为宝”,将植物病毒感染性载体改造为高效的外源基因表达工具^[15,16]。植物病毒载体从最初表达目的蛋白(virus-mediated overexpression, VOX)的1.0版本,升级到用于高通量基因功能鉴定的病毒诱导基因沉默载体(virus-induced gene silencing, VIGS)的2.0版本,近期又发展为病毒诱导的基因编辑(virus-induced gene-editing, VIGE)的3.0版本^[17]。在植物病毒的基因组中插入表达基因编辑元件(Cas蛋白和/或gRNA),利用病毒复制表达高丰度的Cas/gRNA,进而在寄主植物体内引发高效的基因编辑。VIGE整合了病毒高效表达载体和CRISPR/Cas系统的优势,为植物基因功能研究、作物改良和植物生物技术应用开辟了新途径^[3]。

近年来,植物的正义RNA病毒(positive-stranded RNA viruses)、负义RNA病毒(negative-stranded RNA viruses)以及DNA病毒都广泛应用于VIGE体系。一般情况下,正义RNA病毒的表达载体构建简便,但由于基因组较小,能够承载的外源基因片段长度较小(1~2 kb),通常在Cas9转基因植物中递送gRNAs,诱导基因编辑。负义RNA病毒载体构建过程比较复杂、难度大,然而其基因组比较大并且重组几率低,能够稳定表达Cas蛋

白以及gRNAs等编辑元件,可以直接在非转基因植物中引起基因编辑。一些DNA病毒仅保留病毒复制相关组分,构建微型复制子体系,也能够引起局部基因编辑。下面通过病毒递送能力的不同,分别进行阐述(图1)。

2.1 正义RNA病毒递送sgRNA的VIGE体系

正义RNA病毒一般侵染能力强、寄主范围广,已经在多种植物上成功诱导基因编辑(图1(a))。2015年, Ali等人在烟草脆裂病毒(*Tobacco rattle virus*, TRV)的RNA2载体中插入sgRNAs,成功在Cas9转基因的拟南芥和本生烟诱导基因编辑,在侵染植株的部分子代植株中也检测到基因编辑,说明重组的TRV病毒可以进入生殖细胞引发可遗传编辑^[18]。随后,烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)载体外壳蛋白基因的位置替换为sgRNA,在Cas9瞬时表达的细胞内产生基因编辑^[19]。甜菜坏死黄脉病毒(*Beet necrotic yellow vein virus*, BNYSV)^[20],马铃薯X病毒(*Potato virus X*, PVX)^[21],豌豆早褐病毒(*Pea early browning virus*, PEBV)^[22]均能够递送sgRNAs至Cas9转基因本生烟上诱导基因编辑。为了获得可遗传的基因编辑,研究人员将拟南芥*FLOWERING LOCUS T*(*FT*)基因的移动元件融合到sgRNA的3'末端,增强其移动性,使TRV在烟草中介导的编辑效率提高到90%~100%,并且可遗传编辑效率也显著提升^[23]。PVX也可以递送融合FT移动元件的多个串联sgRNAs,在转基因Cas9的本生烟中实现多基因编辑^[24]。

一些重要的禾本科单子叶植物的遗传转化相对困难,利用VIGE培育单子叶编辑植株更加有应用价值。目前已报道利用正义RNA病毒在单子叶农作物中递送sgRNA实现基因编辑。大麦条纹花叶病毒(*Barley stripe mosaic virus*, BSMV)基因组具有 α , β , γ 三条链,能够侵染大麦、小麦、玉米等多种重要的单子叶农作物。中国农业大学生物学院李大伟、张永亮团队开发了基于BSMV的VIGE载体,在其 γ 链上的 γ b蛋白编码框后面插入sgRNA序列,能够高效地递送sgRNA,在Cas9转基因的本生烟、小麦和玉米的体细胞内均能诱导基因编辑^[25]。随后,李大伟、张永亮团队与中国科学院遗传与发育生物学研究所王延鹏团队合作,利用BSMV能够进入生殖细胞进行种子传播的特点,BSMV-VIGE载体在Cas9转基因小麦上递送sgRNAs,可以高效地获得编辑子代植株^[26]。同时,作者通过将病毒诱导编辑的Cas9转

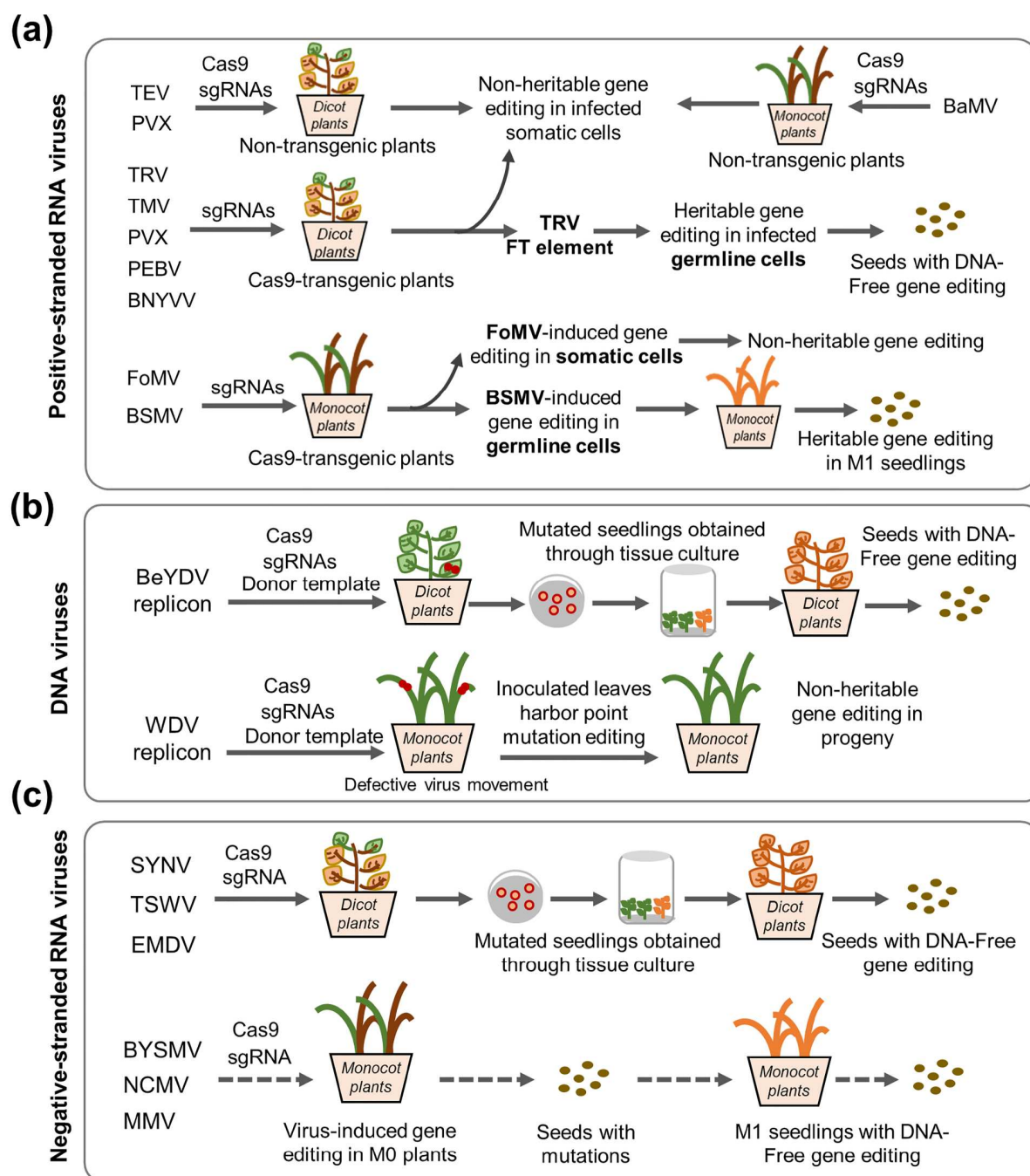


图 1 病毒诱导的基因编辑模式。(a) 正义RNA病毒介导的基因编辑。FT, FLOWERING LOCUS T, 可移动元件。(b) DNA病毒介导基因编辑。Replicon为微型复制子, 仅保留复制组分的病毒缺失突变体, 可以表达外源蛋白, 但病毒丧失了移动能力。(c) 负义RNA病毒介导的基因编辑, 其中实线箭头表示已经获得成功, 而虚线箭头还有待实现

Figure 1 Models for plant virus-induced gene editing systems. (a) Positive-stranded RNA viruses-based VIGE systems. FT, FLOWERING LOCUS T, a mobile RNA element. (b) DNA viruses-based VIGE systems. Replicons are defective virus movement by replacing genes of infection and cell-to-cell movement with heterologous sequences. (c) Negative-stranded RNA viruses-based VIGE systems. Arrows with solid lines indicate well-established systems. Arrows with dashed line indicate the predicted systems to be achieved

基因小麦的花粉与未转基因植株进行杂交, 再通过自交分离, 会获得无外源基因成分的编辑植株^[26]。近期,

利用BSMV-VIGE载体将小麦赤霉病的编码富组氨酸钙结合蛋白的感病基因*TaHRC*进行编辑, 产生了预期

的赤霉病抗性表型^[27](图1(a)). 另外一个侵染单子叶植物的狗尾草花叶病毒(*Foxtail mosaic virus*, FoMV)可以将sgRNAs瞬时递送到Cas9转基因的本生烟, 玉米和谷子的体细胞内引发基因编辑^[28](图1(a)).

2.2 正义RNA病毒递送Cas蛋白和sgRNA的VIGE体系

上述正义RNA病毒递送sgRNA能够实现对靶标基因的高效编辑, 但是此过程依赖Cas9转基因植物, 仍有局限性. 因此, 开发能同时递送Cas9蛋白及sgRNA的植物病毒载体, 才能完全摆脱转基因的依赖, 扩大VIGE的应用范围. 正义RNA病毒PVX载体的TGBs与CP编码框之间可以同时插入Cas9和sgRNAs, 并利用农杆菌浸润的方式接种本生烟, 能够在接种叶片中检测到较高的编辑效率, 但是这种接种方式仍然会引起农杆菌介导的T-DNA插入^[21](图1(a)). 近期, 竹子花叶病毒(*Bamboo mosaic virus*, BaMV)也能够同时递送Cas9和sgRNAs在本生烟和竹子的体细胞上引起无外源基因成分的基因编辑^[29]. 为了增加编辑效率, 利用两种病毒分别表达Cas9蛋白及sgRNA, 同时侵染同一植物细胞, 可以引发基因编辑. 例如, 科研人员利用烟草蚀纹病毒(*Tobacco etch virus*, TEV)表达Cas12a蛋白, 与携带sgRNA的PVX病毒共同侵染烟草, 便能够实现对烟草体细胞的编辑, 其编辑效率达到80%^[30](图1(a)).

2.3 DNA病毒递送Cas蛋白和sgRNA的VIGE体系

目前常见的DNA病毒VIGE载体通常是仅保留病毒复制相关组分, 构建病毒的微型复制子体系. 因为这些缺陷型病毒丧失了系统侵染能力, 只能在接种叶上在病毒复制元件的驱动下瞬时表达外源蛋白(图1(b)). 大豆黄矮病毒(*bean yellow dwarf virus*, BeYDV)的复制子体系在烟草体细胞中同时表达了Cas9蛋白、sgRNAs以及用于重组的同源修复序列, 实现了对烟草ALS(*acetolactate synthase*)基因的定点突变, 获得了抗除草剂植株; 利用该BeYDV载体在马铃薯中实现了对外源GUS基因的同源修复以及内源ALS的靶向点突变^[31]. 利用BeYDV, 在番茄中将35S强启动子定向插入至花青素合成基因ANT1的上游, 通过再生获得了高花青素表达的可遗传编辑后代, 并且其编辑效率相较于传统的农杆菌介导法要提升10倍^[32]. 此外, 双生病毒介导的VIGE还能用于编辑单子叶植物基因. 小麦矮缩病毒(*wheat dwarf virus*, WDV)载体也可搭载Cas9基因和

sgRNAs, 通过基因枪轰击愈伤组织的方法, 在小麦中实现了外源基因的同源修复以及靶标基因的定点突变^[33](图1(b)). 双生病毒介导的VIGE虽然效率很高, 但病毒不具有侵染性, 无法进入生殖细胞获得可遗传编辑. 值得强调的是, 双生病毒微型复制子体系的最大优势是可以提供DNA修复模板, 提高同源性定向修复引导的精准编辑效率(图1(b)).

2.4 负义RNA病毒载体递送Cas蛋白和sgRNA的VIGE体系

近年来, 负义RNA病毒载体的成功构建为VIGE提供了更强大的递送体系. 负义RNA病毒反向遗传学体系构建过程中, 不但需要基因组RNA, 还需要表达几个复制酶蛋白, 才能组装成一个有活性的病毒复合体, 因此构建过程比正义RNA病毒和DNA病毒复杂、难度大^[34,35]. 因此, 相对于正义RNA病毒和DNA病毒, 植物负义RNA病毒的反向遗传学研究至少落后30年. 在负义RNA病毒的研究方面, 中国学者率先取得了突破, 取得了国际领先的研究成果^[36,37]. 2015年, 浙江大学李正和教授课题组利用苦苣菜黄网病毒(*Sonchus yellow net virus*, SYNJV)建立了第一个植物负义RNA病毒的反向遗传学研究系统, 通过瞬时表达基因组和3个复制酶蛋白等多个组分, 在本生烟上建立系统侵染^[38]. 2019年, 本课题组构建首个侵染单子叶植物的负义RNA病毒—大麦黄条点花叶病毒(*barley yellow striate mosaic virus*, BYSMV)的反向遗传学系统, 在大麦、小麦、玉米等单子叶植物以及昆虫介体上都能够高效地侵染, 还可以同时表达3个外源蛋白^[39,40]. 2020年, 南京农业大学陶小荣教授课题组报道了多组分负义RNA病毒—番茄斑萎病毒(*tomato spotted wilt virus*, TSWV)的反向遗传学体系^[41]. 这些反向遗传学体系的构建为VIGE提供强有力的递送工具.

与正义RNA病毒相比, 负义RNA病毒具有更长的基因组, 搭载外源基因的能力更强, 能够同时递送Cas9蛋白及sgRNA整套的编辑元件, 诱导高效的基因编辑(图1(c)). 由于其构建难度大, 目前仅有少数几个的负义RNA病毒被改造为编辑载体, 具有较强的应用潜力. 例如, 浙江大学李正和教授团队利用SYNV携带Cas9蛋白以及sgRNAs侵染本生烟, 在系统侵染叶诱导高效的基因编辑, 再取编辑的系统叶进行组织培养, 可得到无外源基因成分的编辑子代^[42](图1(c)). 李正和教授团队又将TSWV基因组糖蛋白GP的阅读框替换为Cas9蛋

白,将病毒NSs蛋白替换为sgRNAs构建了重组病毒,成功在本生烟、辣椒等多种茄科植物中实现了高效的体细胞编辑,再通过诱导愈伤组织和组织再生,获得无毒的编辑子代^[43](图1(c)).近期,李正和教授团队开发一个新的负义RNA弹状病毒茄斑驳矮化病毒(*Eggplant mottled dwarf virus*, EMDV)载体直接向烟草中递送CRISPR/Cas9核酸酶,以病毒系统侵染组织为外植体,进行组织培养获得突变体植株,突变也可稳定地遗传至后代^[44](图1(c)).

上述研究表明负义RNA病毒介导的基因编辑具有非常大的优势,目前主要是在茄科植物上完成高效编辑,并获得无外源基因成分的编辑子代植株,可以用来培育抗病高产的植物,应用潜力大.然而,这些重组病毒不能侵染发病植物的生殖细胞,因此不能直接获得编辑子代.目前,缺乏能够侵染禾本科农作物的负义RNA编辑载体,同时由于单子叶植物的侵染叶片组织培养的难度大,因此利用负义RNA病毒载体在禾本科农作物上引起可遗传的基因编辑尚有待突破.目前,负义RNA病毒在单子叶植物的反向遗传学体系仅有三例,包括本课题组构建的BYSMV^[39]和北方禾谷花叶病毒(*northern cereal mosaic virus*, NCMV)^[45],以及由北卡罗莱纳州立大学的Whitfield教授课题组构建的玉米花叶病毒(MMV)^[46](图1(c)).其中, BYSMV载体搭载Cas9和sgRNAs能够在本生烟侵染叶片上引起高效的体细胞编辑^[39],说明该病毒载体有潜在在禾本科农作物上引发基因编辑,提高农作物育种效率(图1(c)).此外, BYSMV还在灰飞虱昆虫介体内大量增殖^[39],通过病毒载体改造昆虫介体的基因组也有助于昆虫相关研究.通过进一步改造病毒序列,如果能进入生殖细胞,引起可遗传编辑,对难以转化和再生的禾本科农作物来说,更加具有实用价值.

3 植物病毒介导基因编辑的优势

目前, VIGE已经开始应用于植物基因功能研究和作物遗传改良等方面,尤其是能够递送整套编辑元件的负义RNA病毒载体,相较于传统的植物基因编辑方法,显示出一系列显著的优势^[47].

首先,负义RNA病毒介导的VIGE不依赖遗传转化,省时省力.传统的植物基因编辑方法,如农杆菌介导的转化和基因枪轰击等方法,需要经过复杂的组织培养和再生过程,不仅耗时费力,而且对于许多难以转化的植物品种来说,成功率低.而VIGE技术则可以绕过这

些繁琐步骤,直接通过病毒接种将基因编辑元件递送至植物细胞内.例如,利用SYNV, TSWV和EMDV通过接种可以将CRISPR/Cas系统快速导入茄科植物中,实现对目的基因的编辑^[42-44].该方法大大缩短了基因编辑的时间,提高了育种效率.一般情况下,使用病毒介导的基因编辑技术,从开始实验到获得基因编辑植株,通常只需要数周时间,而传统方法则可能需要时间更长.因此,利用VIGE技术可以大规模地突变感兴趣的基因,高通量地研究植物基因功能.

其次,负义RNA病毒介导的VIGE编辑植物无外源转基因成分,安全性高.植物的无外源基因成分的基因编辑是指在进行基因编辑后,移除CRISPR-Cas编辑元件和标记基因,从而获得不含外源DNA的编辑植株.在传统的转基因过程中,外源基因往往会随机整合到植物基因组中,会引发生物安全问题.由于植物病毒RNA在复制过程中没有DNA的中间形式,不会整合到植物基因组中,通过瞬时表达编辑元件引起基因编辑后,无外源转基因成分的残留^[14].此优势使VIGE的基因编辑植物在生物安全性更高,更易于被公众接受^[47].

最后, VIGE介导的植物基因编辑效率更高,应用性强.病毒在寄主细胞内复制效率高,能够表达高丰度的基因编辑元件,造成的编辑效率也很高,同时病毒介导的基因编辑技术还可以实现对多个基因的同时编辑.通过构建能够同时携带多个向导RNA(gRNA)的病毒载体,可以引导Cas9蛋白同时靶向多个目标基因,可以实现多基因的协同编辑,这对于农作物复杂性状的改良具有重要的应用价值^[47].

4 VIGE技术面临的挑战和发展方向

VIGE技术整合了病毒载体高效表达和CRISPR/Cas精准突变的优势,为植物基因功能研究和作物改良提供了创新的工具和方法.该技术不仅能够实现基因的高效编辑,还可以避免外源基因的整合,在基础研究和实际育种过程中都具有重要意义.尽管VIGE技术展现出巨大的潜力,但在实际应用中仍然面临诸多挑战,需要进一步改造和创新.

首先,病毒载体的容量有限是一个亟待解决的问题.常用的正义RNA病毒的基因组长度有限,对外源基因的承载能力一般在1~2 kb左右,难以容纳Cas9等大分子蛋白的完整基因序列.而负义RNA病毒载体承载能力比较强,能够容纳Cas9和gRNA,然而对分子量更大

的单碱基编辑器和精准编辑器也比较困难。其次,病毒载体的稳定性和传播效率也有待提高。病毒载体在搭载外源基因后,其稳定性和侵染能力也会受到显著影响,从而降低基因编辑效率;不同植物品种对病毒的敏感性存在差异,也会影响病毒载体的应用范围。最后,编辑的效率优化和安全性评估也是一个需要关注的问题。不同植物物种和不同病毒载体之间的兼容性有差异,会导致编辑效率的差别。VIGE是否引起脱靶效应,如何提高基因编辑的特异性和安全性也是使用过程中需要考虑的因素。

为了解决上述问题,需要在下面几个方面展开系统性研究:首先挖掘新的病毒资源,开发新型病毒载体,扩大宿主范围和提高编辑效率。自然界具有丰富的病毒资源,近期的高通量测序分析获得了大量隐藏的病毒资源^[48]。通过筛选出那些具有广谱高效侵染能力、更大的基因组容量以及更稳定的病毒,开发出性能更佳的病毒载体系统。近期,中国科学技术大学吴清发教授从网上数据库下载的17115份水稻转录组数据中挖掘到500多种新病毒,将为病毒载体的开发提供病毒资源^[49]。其次开发更小型的基因编辑元件也是解决病毒载体容量限制的重要途径。目前常用的Cas9蛋白较大,给病毒载体的递送带来了困难。一些更小型的核酸酶,例如CasΦ^[50]和TnpB家族蛋白^[51]分别仅有常用的Cas9

(1300~1400个氨基酸)的1/2和1/3大小,麻省理工学院张锋教授最近发现的TIGR-Tas编辑系统的Tas蛋白^[52]大小仅为Cas9的四分之一,这些新型编辑器的功能正在逐渐优化,更适合病毒载体的递送。此外,为了避免环境释放,病毒的安全化改造研究也需要进一步加强,可将病毒介体传播相关的基因进行突变,阻断病毒在自然环境中的传播能力,提高安全性。

5 总结与展望

植物病毒介导的基因编辑技术结合了病毒载体和CRISPR/Cas编辑系统的优势,不仅实现基因的高效编辑,还避免外源基因的稳定整合,为植物基因功能研究和作物性状改良提供了新的工具和方法。随着技术的不断优化和完善,植物病毒介导的基因编辑技术有望在植物科学研究和农业育种应用中发挥越来越重要的作用。VIGE可以用于快速创制优良种质资源,提高作物的产量、品质和抗逆性,在多基因编辑、精准编辑、无标记编辑以及作物驯化等方面应用前景广阔。在推广应用VIGE技术同时,也需要考虑其可能带来的生物安全风险。例如,病毒载体在环境中的扩散风险,编辑植物对生态系统的潜在影响等。因此,在技术开发和应用过程中,需要建立完善的风险评估管理,确保VIGE技术的安全性和可持续性。

参考文献

- 1 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable Dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 2 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 3 Zhu H, Li C, Gao C. Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 661–677
- 4 Ahmar S, Hensel G, Gruszka D. CRISPR/Cas9-mediated genome editing techniques and new breeding strategies in cereals – current status, improvements, and perspectives. *Biotechnol Adv*, 2023, 69: 108248
- 5 Elsharawy H, Refat M. CRISPR/Cas9 genome editing in wheat: enhancing quality and productivity for global food security—a review. *Funct Integr Genomics*, 2023, 23: 265
- 6 Zou J, Huang Y, Gao C, et al. Unlocking crop diversity: enhancing variations through genome editing. *Sci Bull*, 2024, 69: 281–284
- 7 Li B, Sun C, Li J, et al. Targeted genome-modification tools and their advanced applications in crop breeding. *Nat Rev Genet*, 2024, 25: 603–622
- 8 Wang K, Liu H, Du L, et al. Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15: 614–623
- 9 Svitashv S, Schwartz C, Lenderts B, et al. Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun*, 2016, 7: 13274
- 10 Liang Z, Chen K, Zhang Y, et al. Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 *in vitro* transcripts or ribonucleoproteins. *Nat Protoc*, 2018, 13: 413–430
- 11 Lowe K, Wu E, Wang N, et al. Morphogenic regulators *baby boom* and *wuschel* improve monocot transformation. *Plant Cell*, 2016, 28: 1998–2015
- 12 Wang K, Shi L, Liang X, et al. The gene *TaWOX5* overcomes genotype dependency in wheat genetic transformation. *Nat Plants*, 2022, 8: 110–117
- 13 Maher M F, Nasti R A, Vollbrecht M, et al. Plant gene editing through *de novo* induction of meristems. *Nat Biotechnol*, 2020, 38: 84–89

- 14 Yang L, Machin F, Wang S, et al. Heritable transgene-free genome editing in plants by grafting of wild-type shoots to transgenic donor rootstocks. *Nat Biotechnol*, 2023, 41: 958–967
- 15 Uranga M, Daròs J. Tools and targets: the dual role of plant viruses in CRISPR–Cas genome editing. *Plant Genome*, 2023, 16: e20220
- 16 Abrahamian P, Hammond R W, Hammond J. Plant virus–derived vectors: applications in agricultural and medical biotechnology. *Annu Rev Virol*, 2020, 7: 513–535
- 17 Cody W B, Scholthof H B. Plant virus vectors 3.0: transitioning into synthetic genomics. *Annu Rev Phytopathol*, 2019, 57: 211–230
- 18 Ali Z, Abul-faraj A, Li L, et al. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. *Mol Plant*, 2015, 8: 1288–1291
- 19 Cody W B, Scholthof H B, Mirkov T E. Multiplexed gene editing and protein overexpression using a *tobacco mosaic virus* viral vector. *Plant Physiol*, 2017, 175: 23–35
- 20 Jiang N, Zhang C, Liu J, et al. Development of *Beet necrotic yellow vein virus*-based vectors for multiple-gene expression and guide RNA delivery in plant genome editing. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 1302–1315
- 21 Ariga H, Toki S, Ishibashi K. Potato virus X vector-mediated DNA-free genome editing in plants. *Plant Cell Physiol*, 2020, 61: 1946–1953
- 22 Ali Z, Eid A, Ali S, et al. Pea early-browning virus-mediated genome editing via the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Virus Res*, 2018, 244: 333–337
- 23 Ellison E E, Nagalakshmi U, Gamo M E, et al. Multiplexed heritable gene editing using RNA viruses and mobile single guide RNAs. *Nat Plants*, 2020, 6: 620–624
- 24 Uranga M, Aragonés V, Selma S, et al. Efficient Cas9 multiplex editing using unspaced sgRNA arrays engineering in a *Potato virus X* vector. *Plant J*, 2021, 106: 555–565
- 25 Hu J, Li S, Li Z, et al. A barley stripe mosaic virus-based guide RNA delivery system for targeted mutagenesis in wheat and maize. *Mol Plant Pathol*, 2019, 20: 1463–1474
- 26 Li T, Hu J, Sun Y, et al. Highly efficient heritable genome editing in wheat using an RNA virus and bypassing tissue culture. *Mol Plant*, 2021, 14: 1787–1798
- 27 Chen H, Su Z, Tian B, et al. Development and optimization of a *Barley stripe mosaic virus*-mediated gene editing system to improve Fusarium head blight resistance in wheat. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20: 1018–1020
- 28 Mei Y, Beernink B M, Ellison E E, et al. Protein expression and gene editing in monocots using foxtail mosaic virus vectors. *Plant Direct*, 2019, 3: e00181
- 29 Wu L, Yang J, Gu Y, et al. *Bamboo mosaic virus*-mediated transgene-free genome editing in bamboo. *New Phytol*, 2025, 245: 1810–1816
- 30 Uranga M, Vazquez-Vilar M, Orzáez D, et al. CRISPR–Cas12a genome editing at the whole-plant level using two compatible RNA virus vectors. *CRISPR J*, 2021, 41: 761–769
- 31 Baltes N J, Gil-Humanes J, Cermak T, et al. DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell*, 2014, 26: 151–163
- 32 Čermák T, Baltes N J, Čegan R, et al. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol*, 2015, 16: 232
- 33 Gil - Humanes J, Wang Y, Liang Z, et al. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *Plant J*, 2017, 89: 1251–1262
- 34 Li Z, Zhao C. Plant negative-stranded RNA virus biology and host interactions revitalized by reverse genetics. *Curr Opin Virol*, 2021, 48: 9
- 35 Zang Y, Fang X D, Qiao J H, et al. Reverse genetics systems of plant negative-strand RNA viruses are difficult to be developed but powerful for virus-host interaction studies and virus-based vector applications. *Phytopathol Res*, 2020, 2: 29
- 36 Wu J, Zhang Y, Li F, et al. Plant virology in the 21st century in China: recent advances and future directions. *J Integr Plant Biol*, 2024, 66: 579–622
- 37 Feng M, Feng Z, Li Z, et al. Advances in reverse genetics system of plant negative-strand RNA viruses. *Chin Sci Bull*, 2020, 65: 4073–4083
- 38 Wang Q, Ma X, Qian S S, et al. Rescue of a plant negative-strand RNA virus from cloned cDNA: insights into enveloped plant virus movement and morphogenesis. *PLoS Pathog*, 2015, 11: e1005223
- 39 Gao Q, Xu W, Yan T, et al. Rescue of a plant cytorhabdovirus as versatile expression platforms for planthopper and cereal genomic studies. *New Phytol*, 2019, 223: 2120–2133
- 40 Fang X D, Yan T, Gao Q, et al. A cytorhabdovirus phosphoprotein forms mobile inclusions trafficked on the actin/ER network for viral RNA synthesis. *J Exp Bot*, 2019, 70: 4049–4062
- 41 Feng M, Cheng R, Chen M, et al. Rescue of tomato spotted wilt virus entirely from complementary DNA clones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117: 1181–1190
- 42 Ma X, Zhang X, Liu H, et al. Highly efficient DNA-free plant genome editing using virally delivered CRISPR–Cas9. *Nat Plants*, 2020, 6: 773–779
- 43 Liu Q, Zhao C, Sun K, et al. Engineered biocontainable RNA virus vectors for non-transgenic genome editing across crop species and genotypes. *Mol Plant*, 2023, 16: 616–63
- 44 Xiang H, Chen B, Wang S, et al. Development of an RNA virus vector for non-transgenic genome editing in tobacco and generation of berberine bridge enzyme-like mutants with reduced nicotine content. *ABIOTECH*, 2024, 5: 449–464

- 45 Fang X, Qiao J, Zang Y, et al. Developing reverse genetics systems of northern cereal mosaic virus to reveal superinfection exclusion of two cytorhabdoviruses in barley plants. [Mol Plant Pathol](#), 2022, 23: 749–756
- 46 Kanakala S, Xavier C A D, Martin K M, et al. Rescue of the first alphanucleorhabdovirus entirely from cloned complementary DNA: an efficient vector for systemic expression of foreign genes in maize and insect vectors. [Mol Plant Pathol](#), 2023, 24: 788–800
- 47 Shen Y, Ye T, Li Z, et al. Exploiting viral vectors to deliver genome editing reagents in plants. [aBIOTECH](#), 2024, 5: 247–26
- 48 Wu Q, Luo Y, Lu R, et al. Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2010, 107: 1606–1611
- 49 Zhu Y, Raza A, Bai Q, et al. In-depth analysis of 17,115 rice transcriptomes reveals extensive viral diversity in rice plants. [Nat Commun](#), 2025, 16: 1559
- 50 Pausch P, Al-Shayeb B, Bisom-Rapp E, et al. CRISPR-CasΦ from huge phages is a hypercompact genome editor. [Science](#), 2020, 369: 333–337
- 51 Xiang G, Li Y, Sun J, et al. Evolutionary mining and functional characterization of TnpB nucleases identify efficient miniature genome editors. [Nat Biotechnol](#), 2024, 42: 745–757
- 52 Faure G, Saito M, Wilkinson M E, et al. TIGR-Tas: a family of modular RNA-guided DNA-targeting systems in prokaryotes and their viruses. [Science](#), 2025, 388: eadv9789

Summary for “植物病毒介导基因编辑的研究进展”

Advances in plant virus-induced gene editing in plants

Xianbing Wang^{*}, Yizhou Yang & Jihui Qiao*State Key Laboratory of Plant Environmental Resilience, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China*^{*} Corresponding author, E-mail: wangxianbing@cau.edu.cn

Precisely mutating plant genomes and directionally improving plant traits to cultivate high-yield, high-quality, and stress-resistant elite crop varieties are crucial for ensuring food security worldwide. The Clustered regularly interspaced short palindromic repeat and their associated protein (CRISPR/Cas9)-based gene editing technology enables precise modification of plant genomes, opening a new era of precision breeding in crops. During the process of genome editing, it is a crucial step to efficiently deliver the CRISPR-Cas components into plant cells for gene editing. Currently, the delivery of gene editing components commonly used in plants mainly relies on traditional methods such as *Agrobacterium*-mediated transgenic technology and gene gun bombardment, and so on. However, bottlenecks such as transformation difficulties, low regeneration efficiency, and genotype dependence are still difficult to overcome in most important crops. In recent years, plant virus-based expression vectors have been widely used for exogenous gene expression and virus-induced gene silencing (VIGS). By inserting editing component genes into plant viral vectors and taking advantage of the efficient infection and expression capabilities of viruses, editing components can be rapidly delivered into plant cells to achieve gene editing. Compared with conventional gene editing methods described above, virus-induced gene editing (VIGE) eliminates the need for tedious processes such as genetic transformation and tissue regeneration. Currently, three main classes of plant viruses have been widely developed into VIGE vectors. Positive-sense RNA (PSR) viruses are relatively easy to be engineered into exogenous gene expression vectors. However, due to their small viral genomes, the length of exogenous gene fragments they can carry is relatively short (1–2 kb). They are usually used to deliver gRNAs in Cas-transgenic plants to induce gene editing. By contrast, negative-sense RNA (NSR) virus vectors are more complex and difficult to develop. Nevertheless, their genomes are relatively large and the probability of recombination is low, enabling them to stably express full editing toolboxes including Cas components and gRNAs. Therefore, NSR virus vectors are used to transiently express all the CRISPR-Cas components and induce non-transgenic gene editing, which is a promising strategy for obtaining DNA-free edited plants. Many DNA viruses can also be developed into virus mini-replicon only maintaining viral replication factors, which can only cause gene editing in local infection leaves. The application of VIGE technology significantly shortens breeding cycles, enhances breeding efficiency, avoids integration of foreign DNA to reduce biosafety risks, and provides an important delivery tool for plant gene editing. Nonetheless, VIGE vectors are still lacking for most monocot plants and non-model dicot plants. Besides, viral vectors for heritable and DNA-free genome editing in crops are urgently needed for molecular breeding. Future studies will aim to explore viral resources for VIGE development, enhance vector stability and safety, and expand the application scope of VIGE vectors.

gene editing, plant virus vectors, delivery vectors, CRISPR/Cas, precision breedingdoi: [10.1360/TB-2025-0177](https://doi.org/10.1360/TB-2025-0177)