植物负链RNA病毒反向遗传学体系前沿研究进展

冯明峰¹, 冯致科¹, 李正和^{2*}, 王献兵^{3*}, 陶小荣^{1*}

1. 南京农业大学植物保护学院, 南京农业大学作物免疫学重点实验室, 南京 210095;

2. 浙江大学生物技术研究所, 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310058;

3. 中国农业大学生物学院, 北京 100193

* 联系人, E-mail: lizh@zju.edu.cn; wangxianbing@cau.edu.cn; taoxiaorong@njau.edu.cn

2020-06-06 收稿, 2020-07-23 修回, 2020-07-24 接受, 2020-07-25 网络版发表

国家自然科学基金(31925032, 31630062, 31870143)资助

摘要 负链RNA病毒是一类动植物上的重要病原, 不仅危害人类、哺乳动物的健康, 而且严重威胁家禽和农作物的安全生产. 病毒反向遗传学体系是一种从cDNA克隆拯救病毒的现代病毒学分子操作技术, 对于研究病毒侵染循环、致病机制和寄主相互作用至关重要. 尽管动物负链RNA病毒反向遗传学体系的构建在20多年前就已取得成功, 但植物负链RNA病毒的反向遗传学体系直到近年才有所突破. 我国和美国科学家通过各种创新手段, 相继成功构建了多种不分节段和分节段植物负链RNA病毒的反向遗传学体系, 为植物负链RNA病毒的进一步深入研究提供了关键的技术体系, 开启了植物负链RNA病毒研究的新时代. 本文系统地回顾了植物负链RNA病毒反向遗传学体系的发展现状和最新研究进展, 并对该领域未来发展方向和应用前景进行了探讨.

关键词 植物负链RNA病毒, 反向遗传学体系, 病毒侵染性克隆, 病毒拯救

负链RNA(negative-stranded RNA, NSR)病毒包括严重危害人类的病毒, 如埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)、狂犬病病毒(rabies virus, RV)、甲型流感病毒(influenza A virus, FLUAV)和裂谷热病毒(Rift Valley fever virus, RVFV). 这些病毒可导致人类相当高的发病率和死亡率, 严重威胁人类和动物的安全, 并造成极为巨大的经济损失^[1,2]. NSR病毒也包括对农业生产有重要影响的植物病毒, 如正番茄斑萎病毒属病毒(orthotospoviruses)、纤丝病毒属病毒(tenuiviruses)和弹状病毒(rhabdoviruses), 它们会造成严重的农作物病害, 对全球粮食安全构成重大威胁^[2-7]. NSR病毒可分为23个科(Arto-, Borna-, Filo-, Lispi-, Mymona-, Nyami-, Paramyxo-, Pneuma-, Rhabdo-, Sun-, Xinmo-, Arena-, Cruli-, Fimo-, Hanta-, Leishbu-, Mypo-, Nairo-, Peribunya-, Phasma-, Phenui-, Tospo-和Wupedeviridae), 前11个含有

单分子基因组RNA, 即不分节段基因组; 后12个分别含有2~8条负链基因组RNAs, 即分节段基因组^[8].

1 病毒反向遗传学体系发展历程

病毒反向遗传学体系是一种从全长cDNA克隆拯救病毒的分子操作技术, 是研究动植物病毒基因功能及病毒复制、转录、移动、包壳、粒体装配和致病机制等病毒基础生物学问题必不可少的关键技术体系, 同时也是研发动物病毒疫苗的重要技术工具.

Racaniello和Baltimore^[9]于1981年率先成功建立了动物正链RNA病毒反向遗传学体系, 奠定了病毒侵染性克隆技术体系的新纪元. 他们将脊髓灰质炎病毒(poliovirus)基因组RNA的cDNA插入细菌表达载体pBR322, 转染哺乳动物细胞后产生了具有侵染性的脊髓灰质炎病毒, 证实正链RNA病毒的全长RNAs转染真

引用格式: 冯明峰, 冯致科, 李正和, 等. 植物负链RNA病毒反向遗传学体系前沿研究进展. 科学通报, 2020, 65: 4073-4083

Feng M F, Feng Z K, Li Z H, et al. Advances in reverse genetics system of plant negative-strand RNA viruses (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 4073-4083, doi: 10.1360/TB-2020-0671

核细胞可表达病毒蛋白,进而使病毒能够在细胞内复制。Ahlquist等人^[10]于1984年以雀麦花叶病毒(brome mosaic virus, BMV)为研究对象,借鉴动物正链RNA病毒的研究经验,构建病毒全长侵染性cDNA克隆,并进行体外转录接种大麦拯救了有侵染性的BMV,成功建立了第一个植物正链RNA病毒的反向遗传学体系。

近30多年以来,反向遗传学体系得到了快速发展,为动植物病毒分子生物学研究作出了巨大的贡献。相对于正链RNA病毒,负链RNA病毒进行遗传操作的难度相对较大,主要原因包括:(1)无核衣壳包裹的病毒基因组RNA(genomic RNA, gRNA)和互补的反基因组RNA(antigenomic RNA, agRNA)没有侵染性;(2)在病毒形成复制或转录所需的互补的agRNA模板时,需要病毒RNA复制酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)的参与;(3)最小的侵染单元必须包括病毒gRNA、agRNA和复制相关的核心蛋白,即核酸核蛋白复合体(ribonucleoprotein complex, RNPs);(4)在病毒复制和粒子包装时需保证基因组RNA 5'和3'非编码区序列的准确性;(5)病毒编码的复制酶RdRp蛋白分子量大,在细胞内表达量低;(6)负链RNA病毒的gRNA和agRNA不能直接作为mRNA进行翻译,必须有病毒的RNA聚合酶和核衣壳蛋白等的共同作用下才能进行复制和转录形成病毒侵染所必需的蛋白;(7)对于分节段负链RNA病毒来说,选择何种启动子表达病毒的gRNA或agRNA也是一个挑战^[7,11,12]。

对于负链RNA病毒来说,建立反向遗传学体系首先需要构建一种称为微型基因组反向遗传学体系^[13,14],此体系可以验证复制复合体核心蛋白是否能够有效启动病毒的复制和转录过程。在这个微型复制子体系中,将报告基因反向插入到病毒基因组并加入病毒复制和转录必需的病毒蛋白,带有报告基因的病毒基因组在病毒蛋白的帮助下可进行复制、转录和翻译。在此基础上,再构建基于全长侵染性克隆的反向遗传学体系,从全长基因组cDNA拯救获得具有活性的负链RNA病毒^[7,12~14]。

2 不分节段负链RNA病毒反向遗传学体系

2.1 动物不分节段负链RNA病毒

单分子负链RNA病毒目(Mononegavirales)家族成员被分为奥托病毒科(Artoviridae)、波纳病毒科(Bornaviridae)、丝状病毒科(Filoviridae)、李氏蜘蛛病毒科

(Lispiviridae)、真菌单股负链RNA病毒科(Myomaviridae)、尼亚米病毒科(Nyamiviridae)、副黏病毒科(Paramyxoviridae)、肺病毒科(Pneumoviridae)、弹状病毒科(Rhabdoviridae)、阳光病毒科(Sunviridae)和新城蚊子病毒科(Xinmoviridae)。其基因组仅由1条负链RNA组成,该类病毒可侵染人类、野生动物和农作物并造成严重的危害,而建立其反向遗传学体系进而拯救该类病毒的侵染性克隆极其困难^[15~17]。为了建立负链RNA病毒反向遗传学体系,起初很多课题组试图获得侵染性的重组单股负链RNA病毒,但是都没有成功拯救病毒全长侵染性克隆。研究人员通过不断地尝试,证实侵染性的辅助病毒或质粒表达蛋白可以实现病毒微型基因组的包壳。这一成果推动了负链RNA病毒反向遗传学体系的研究进程,同时也揭示负链RNA病毒反向遗传学体系相比正链RNA病毒的具有更大的难度^[18~25]。在牛痘病毒(vaccinia virus, VV)系统中,利用T7启动子和T7 RNA聚合酶同时表达水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)核蛋白N、磷蛋白NS和复制酶L促进缺陷型干扰的VSV(defective interfering VSV, VSV-ID)病毒RNA的高效快速复制^[26],而当从cDNA中共表达VSV编码的所有的病毒蛋白N、NS、L、基质蛋白M和糖蛋白G时可支持VSV-ID病毒颗粒的复制、装配和芽殖^[23]。Pattnaik等人^[27]于1992年通过T7启动子驱动产生的VSV-ID RNA和5个病毒蛋白共表达,成功获得了VSV-ID病毒。基于VV T7 RNA聚合酶系统, Schnell等人^[24]将狂犬病毒(rabies virus, RV)反基因组序列插到T7启动子的下游,并在其3'末端融合丁型肝炎病毒(hepatitis delta virus, HDV)核酶(ribozyme, RZ)序列^[28],表达全长RV cDNA的重组载体pSAD L16与RV N、R和L共转染BSR细胞,由重组的VV表达T7 RNA聚合酶, T7启动子驱动产生全长RV RNA,最后成功拯救了RV侵染性克隆^[24],由此证明通过从病毒cDNA中表达RV正义反基因组RNA是取得突破的关键点,至此Schnell等人^[24]于1994年成功建立第一个动物负链RNA病毒侵染性克隆反向遗传学体系。

自RV侵染性克隆体系成功建立之后,有一系列的负链RNA病毒建立了反向遗传学体系,成功的例子包括Rhabdoviruses和Paramyxoviruses被拯救,如VSV、麻疹病毒(measles virus, MV)、牛瘟病毒(rinderpest virus, RPV)、仙台病毒(sendai virus, SeV)、人类呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, hRSV)等^[29~33]。不少成功建立的负链RNA病毒反向遗传学体

系是基于病毒正义基因组RNA的表达策略,而一些科学家尝试了依赖于病毒反义基因组RNA表达策略也可以拯救SeV、EBOV和人类副流感病毒3型(human parainfluenza virus type 3, hPIV3)^[34~36],但是这种方法拯救病毒的效率相对较低。

2.2 植物不分节段负链RNA病毒

植物NSR病毒严重威胁着花卉、蔬菜和农作物的安全生产,每年造成极为严重的经济损失^[7,37,38]。大部分植物NSR病毒都是通过节肢动物媒介昆虫传播,可以在虫体内循环增殖,加速了该类病毒病害的流行与发生^[37,39~41]。已知100多种Rhabdoviruses可以侵染植物,根据其在侵染植物和介体中复制场所不同而分为两个属,在细胞质内复制的细胞质弹状病毒属(*Cytorhabdovirus*)和细胞核内复制的细胞核弹状病毒属(*Nucleorhabdovirus*)^[12,38]。由我国科学家领导的研究团队在前人的基础上,通过多年的不懈努力,率先在国际上建立了上述两类植物不分节段NSR病毒的反向遗传学体系,极大地推动了该类病毒的基因功能和病毒基础生物学问题研究。

2.2.1 Nucleorhabdovirus反向遗传学体系

近20多年以来,因植物NSR病毒反向遗传学体系的缺乏一直制约着植物不分节段NSR病毒基础生物学问题的研究。苦苣菜黄网病毒(sonchus yellow net virus, SYN)是属于Nucleorhabdovirus的模式病毒,在寄主细胞核中复制,美国加州大学伯克利分校Andrew Jackson和浙江大学李正和课题组^[2,42]以SYNV为研究对象,首先成功建立了世界首例植物不分节段NSR病毒微型基因组反向遗传学体系。他们利用35S启动子(RNA聚合酶II)驱动产生SYNV反基因组RNA,在基因组两末端分别添加锤头核酶(hammerhead, HH)和HDV的核酶切割产生精确的病毒RNA序列,并构建携带DsRed和reGFP报告基因的病毒微型基因组报告载体,在核衣壳N、磷蛋白P和复制酶L的共同作用下微型基因组可以进行复制与转录,并产生绿色和红色荧光。基于微型基因组复制体系,他们进一步发现病毒复制所需的5'端前导序列和3'端尾随序列以及N、P和L蛋白对于病毒的复制与转录都是必需的,但锤头核酶HH对其来说却不是必需的,添加病毒RNA沉默抑制子(viral suppressors of RNA silencing, VSRs)P19、HcPro和γb可以提高报告基因的表达效率^[42]。基于SYNV微型基因组体系的基础,李正和课题组^[2]于2015年又成功建立了基于

SYNV全长侵染性克隆的反向遗传学体系,携带SYNV全长基因组植物表达载体pSYNV经35S启动子驱动产生全长的SYNV反基因组RNA,并与N、P和L和VSRs在本氏烟叶片中共表达(图1(a)),成功实现病毒在模式植物本氏烟上的系统侵染。通过优化核心蛋白N、P和L表达模式,将三者串联插入同一个载体获得重组载体NPL,发现pSYNV、NPL和VSRs共表达时拯救SYNV侵染性克隆的效率显著增加,若再额外表达高浓度的L,其效率会更高,证明减少表达载体数和提高L浓度均可以提高拯救SYNV侵染性克隆的侵染率。为了实现病毒的可视化,该课题组在SYNV全基因组中的N和P序列之间插入GFP报告基因,可以示踪SYNV在植物细胞和全株中的侵染。进一步研究也发现,SYNV编码的非结构蛋白sc4是SYNV移动必不可少的,而糖蛋白G是SYNV病毒粒体形态建成必需的^[2]。

近年来,李正和课题组继续深入研究和拓展了SYNV反向遗传学体系基础理论和应用研究。基于SYNV微型基因组体系,发现HH 3'末端切割位点序列为UUCCUAUAGUC时,微型基因组报告基因GFP和RFP荧光表达量明显高于切割位点序列为CCGGGUUC和CCGGGUC。进一步发现当不加HH序列时,由35S启动子直接驱动生成5'末端加帽的微型基因组RNA,报告基因表达量最高,同时也证明了35S启动子驱动产生加帽的病毒基因组RNA可以提高拯救SYNV全长侵染性克隆效率^[43]。该课题组借助SYNV反向遗传学体系在载体构建策略和基因功能等方面也取得了一系列的进展,发展了在酵母细胞-大肠杆菌-农杆菌中的穿梭载体一步法快速构建策略,明确了SYNV的基质蛋白M可以诱发病毒排阻效应,建立了研究移动蛋白(movement protein, MP)功能的植物不分节段NSR病毒微型基因组体系,发现了植物弹状病毒MP的独特性且可以支持植物正链RNA病毒的移动^[43~45]。

2.2.2 Cytorhabdovirus反向遗传学体系

大麦黄条点花叶病毒(barley yellow striate mosaic virus, BYSMV)属于Cytorhabdovirus中的成员之一,该病毒在寄主细胞质内复制和成熟^[39],自然条件下由灰飞虱持久性传播,可以侵染26种禾本科植物,造成严重的农作物产量损失^[5,46,47]。中国农业大学王献兵课题组^[48]采用与SYNV相似的策略,于2019年首次在植物细胞质弹状病毒的反向遗传学体系研究中取得了突破,成功建立了BYSMV微型基因组和全长侵染性克隆体系。他们利用35S启动子驱动产生BYSMV反基因组

图1 植物不分节段和分节段负链RNA病毒反向遗传学系统. 苦苣菜黄网病毒(a)、大麦黄条点花叶病毒(b)、番茄斑萎病毒(c)和玫瑰莲座丛病毒(d)的反向遗传学体系示意图

Figure 1 Reverse genetics system for the nonsegmented and segmented plant negative-strand RNA viruses. Schematic diagram of the reverse genetics system of sonchus yellow net virus (a), barley yellow striate mosaic virus (b), tomato spotted wilt virus (c) and rose rosette virus (d), respectively

RNA, 在N和P位置分别插入报告基因GFP和RFP, 在基因组5'和3'末端分别融合2×35S启动子序列和核酶HDV RZ, 成功构建了病毒微型基因组报告载体, 并与核衣壳N、磷蛋白P、复制酶L和3个VSRs(P19、HcPro和 γ b)在本氏烟叶片中共表达, 微型基因组可以进行复制与转录, 并产生绿色和红色荧光. 在BYSMV反基因组的N和P中间插入报告基因RFP, 获得了由35S启动子驱动

产生BYSMV全长反基因组RNA的表达载体(图1(b)), 在N、P、L和3个VSRs在本氏烟中共表达后可以产生少量具有活性的成熟病毒颗粒, 其浸润叶也可检测到RFP荧光, 在模式植物本氏烟中BYSMV可以从cDNA中被成功拯救^[49].

拯救的BYSMV如何实现在自然寄主大麦中建立反向遗传学体系是必须解决的重要科学问题. 王献兵

课题组进一步通过系统深入地研究最终攻克了这一难题。由于传毒介体灰飞虱不能直接取食模式植物本氏烟,该课题组采取了一种非常巧妙的方法,将本氏烟中拯救的BYSMV用优化的磷酸盐缓冲液充分研磨,抽提富集BYSMV后显微注射灰飞虱,并用健康的水稻幼苗饲喂注射后的灰飞虱,10 d后可以检测到灰飞虱表达RFP荧光,结果表明拯救的BYSMV可以在介体昆虫灰飞虱体内循环增殖。进一步将获毒的灰飞虱转接健康的大麦幼苗,发现拯救的BYSMV可以侵染大麦幼苗,报告基因RFP也可以在大麦中表达^[49]。最终该课题组成功建立了在本氏烟-灰飞虱-大麦-玉米等中的BYSMV全长基因组反向遗传学体系,为寄主植物-病毒-介体昆虫三者互作研究提供了强有力的分子操纵工具。

进一步研究发现, BYSMV全长基因组可以同时携带GFP、RFP和CFP三种不同颜色的报告基因在植物和昆虫介体中共表达,实现了该病毒在细胞内的多重标记。当GUS和RFP同时插入BYSMV全长基因组时,二者均可以在小麦、大麦和玉米系统侵染叶和根中表达,为研究禾本科植物的基因表达模式提供了一个关键的病毒分子操作体系。该课题组还发现, BYSMV可以同时插入RFP、Cas9和sgRNA发展为基因编辑载体,可以对转基因16c本氏烟浸润细胞中的GFP基因进行了编辑^[49]。由此可知, BYSMV反向遗传学体系,在细胞内不仅可以同时表达多色报告基因,也可以表达大蛋白Cas9,将为病毒示踪和禾本科基因编辑等方面提供新的理论和分子工具。

3 分节段负链RNA病毒反向遗传学体系

3.1 动物分节段负链RNA病毒

沙粒病毒目(Arenavirale)、布尼亚病毒目(Bunyavirale)和正黏病毒目(Orthomyxovirale)是主要的分节段负链RNA病毒^[50,51]。其中Bunyavirale病毒是一种典型的三节段负链RNA病毒^[1,51],基因组包括RNA-S、-M与-L,采用反义或双义编码策略,以病毒gRNA或agRNA为模板进行复制和转录,其转录通过一种特有的“抓帽切割”和“引物重配”机制完成^[50,52],且病毒的结构蛋白由基因组的反向开放阅读框编码。相对于不分节段负链RNA病毒,分节段负链RNA病毒的反向遗传学体系更具有挑战性。Elliott实验室^[53]最早建立了首个布尼亚动物病毒微型基因组反向遗传学体系,他们将正

布尼亚病毒科(Orthobunyovirus)的布尼亚韦拉病毒(Bunyamwera virus, BUNV)的S负链基因组置于T7启动子下游,并将报告基因CAT替换S基因组反向编码的核衣壳N,通过体外转录后将病毒RNA转染已经表达S和L基因组上蛋白的细胞,成功地在转染的细胞中检测到CAT活性;进一步对参与转录和复制的蛋白的鉴定表明,病毒的复制酶RdRp和核衣壳N对于微型基因组的复制是必需的^[53]。Lopez等人^[54]则利用修饰后的噬菌体T7 RNA聚合酶强启动子 Φ 10表达含报告基因CAT的RVFV S负链微型基因组,发现L编码的复制酶RdRp和S编码的核衣壳N对于复制与转录是必需的,而NSs则不是必需的。Bridgen和Elliott等人^[55]进一步将T7启动子驱动的携带报告基因GFP的S微型基因组载体转染到细胞内部,并由病毒载体在细胞内表达T7 RNA聚合酶来起始病毒微型基因组RNA的转录,成功建立了质粒来源的微型基因组反向遗传学体系。奥罗普切病毒(Oropouche virus, OROV)是流行于南美洲并导致发热、呕吐、寒战等致病症状的布尼亚病毒, Elliott课题组^[56]利用T7启动子对其成功建立了微型基因组反向遗传学体系。

RNA聚合酶I(Pol I)驱动的转录产物,5'端没有帽子结构而3'端没有poly(A)尾巴,因此这种类型的启动子也被用来构建白蛉病毒科尤库尼米病毒(Uukuniemi virus, UUKV)的微型基因组反向遗传学体系。将报告基因CAT或GFP插入到病毒M基因组5'和3'非编码区之间,再将其导入表达有核衣壳N、复制酶RdRp和非结构蛋白NSs的细胞中可以成功表达报告基因,单独导入报告质粒则并不能发生转录,转录活性依赖于N和RdRp共同作用,而进一步测试表明NSs并不是必需的^[57]。Flick等人^[58]利用Pol I对克里米亚-刚果出血热病毒(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, CCHFV)的S基因组进行反向遗传学报告体系的构建,当在野生型病毒的帮助下它可激活报告基因GFP或CAT的表达。

Elliott课题组^[55]于1996年率先成功地建立了布尼亚韦拉病毒全长cDNA的反向遗传学体系。通过T7启动子驱动正链的3条基因组RNAs的质粒共转染细胞,由VV病毒载体表达T7 RNA聚合酶,并同时用病毒载体表达病毒3条链上的核衣壳N、复制酶RdRp和糖蛋白Gn/Gc,成功拯救了具有侵染活性的布尼亚韦拉病毒。Elliott实验室^[13]进一步优化这一体系,在细胞体内组成型表达T7 RNA聚合酶,发现在用病毒表达T7聚合酶时,除了需要RdRp和N外,还必须有糖蛋白Gn/Gc存在时才

可以实现有活性病毒的拯救,而优化的体系只要5个质粒,甚至发现不用辅助质粒表达N和RdRp,只表达3条基因组的质粒也可以成功实现病毒的拯救。Blakqori与Weber^[59]基于Elliott研究组优化的体系对同一个科中的拉克罗斯病毒(La Crosse virus, LACV)成功实现了病毒的拯救,发现仅转染3个质粒即可实现病毒的侵染,但是和其他病毒不同,拉克罗斯病毒在转染时若加入辅助质粒则会抑制有侵染活性的病毒产生。使用类似的策略,Ikegami等人^[60]对RVFV的全长基因组也进行了拯救,发现额外添加病毒编码的蛋白不是必需的,且共表达NSs反而抑制有活性的病毒产生。Ogawa等人^[61]利用Pol I启动子的特点对正布尼亚病毒科阿卡班病毒(Akabane virus, AKAV)进行了拯救,虽然Pol I启动子在细胞核内产生RNA,但是对于在细胞质中复制的布尼亚目病毒也同样起作用。而Billecocq等人^[62]也用Pol I启动子的策略对RVFV全长基因组成功实现了拯救,发现N和RdRp对于形成有活性的病毒是必需的,而糖蛋白Gn/Gc则不是必需的。发热伴血小板减少综合征病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)是一种2009年在中国首先出现的新型昆虫传布尼亚病毒。Elliott课题组^[63]使用T7启动子也成功建立了该病毒的微型基因组复制体系,并对其进行了全长基因组的成功拯救。

正黏病毒科的甲型流感病毒含有8条负链基因组RNAs。Neumann等人^[64]用Pol I启动子驱动8条基因组RNAs产生,与Pol II启动子驱动表达核衣壳NP、复制酶PA、PB1和PB2的质粒共转染细胞成功拯救了有活性的病毒。随后同科的含有6条负链基因组RNAs的索戈托病毒(Thogoto virus, THOV)也使用Pol I启动子驱动产生6条基因组RNAs,发现与病毒编码蛋白NP、PA、PB1、PB2、M和GP共转染细胞,通过12个质粒在同一个细胞内起作用实现了有活性的病毒的拯救^[65]。沙粒病毒科的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)是二节段负链/双义RNA病毒,包含S和L两条基因组RNA。Flatz等人^[66]用Pol I驱动S和L基因组RNAs表达,与Pol II启动子驱动的最小病毒侵染组分核衣壳NP和复制酶L共转染到细胞内,成功拯救了有活性的病毒,也建立了Pol I-Pol II双启动子驱动从cDNA中拯救负链RNA病毒反向遗传学体系的有效策略。

截至目前,动物病毒分节段负链RNA病毒的反向遗传学体系得到了迅速发展,为该类病毒复制、转录

和病毒颗粒成熟所需的顺式作用元件和病毒反式作用蛋白的研究开辟了新的途径。另外,在病毒基因组上引入特定的突变位点就能分析在自然条件下感染的病毒在体内所出现的突变表型,这对于在细胞和分子水平上了解病毒-宿主互作的复制、转录、包壳和致病分子机制作出了巨大贡献。这些反向遗传学体系的建立,为研究人员提供了病毒学研究的新型的强有力的技术手段,同时这些体系的发展也为用于疫苗和基因治疗为目的动物病毒载体改造铺平了道路^[13,14,67]。

3.2 植物分节段负链RNA病毒

3.2.1 Orthotospovirus反向遗传学体系

反向遗传学体系在动物分节段负链RNA病毒已经取得了突破,但是在植物分节段负链RNA病毒方面一直是该领域的一个难题。全世界很多课题组尝试建立植物分节段RNA病毒的反向遗传学体系,然而都以失败而告终。番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)是布尼亚病毒目正番茄斑萎病毒属(*Orthotospovirus*)的一个代表种,该病毒包含S、M和L三条基因组RNAs,可编码6个病毒蛋白,自然条件下由农业害虫西花蓟马传播,严重威胁重要经济作物的安全生产,每年给全球造成近10亿美元损失^[7,37,68~70]。2017年,日本的Ishikawa课题组^[71]通过优化编码序列氨基酸密码子合成了TSWV编码的复制酶RdRp和核衣壳N两个基因序列。为使RdRp和N蛋白在酵母细胞更好地表达,将S负链基因组中的反向编码的N用报告基因YFP替换,并构建了铜离子诱导性启动Cup1驱动的微型基因组,与Cup1驱动优化型RdRp和N在酵母细胞内共表达,发现TSWV S微型基因组RNA在细胞内可以复制,但是没有转录活性。近期,南京农业大学陶小荣课题组^[7]通过近10年不断攻坚,率先在植物分节段负链RNA病毒反向遗传学体系取得了重要的创新性成果。该课题组首先明确了驱动TSWV基因组RNA的合适的启动子,发现先前在建立动物负链RNA病毒反向遗传学体系研究中报道的T7启动子在植物细胞内均不能驱动生成有活性的TSWV微型基因组RNA,而属于Pol II的35S启动子在植物细胞内可以驱动病毒基因组RNA生成。接着通过优化合成RdRp全长基因序列,实现了将近330 kD病毒复制酶在植物中成功表达。在此基础上,将S负链基因组RNA中的NSs和N分别用报告基因mCherry和eGFP替换获得微型基因组报告载体,基因组5'和3'末端分别融合锤头核酶HH和HDV核酶RZ负责切割生成精

确的基因组RNA, 并与N、优化型RdRp和VSRs在模式植物本氏烟叶片中共表达, 成功建立了TSWV S微型基因组复制体系。将M负链基因组中反向编码的Gn/Gc基因用报告基因eGFP替换, 保留移动蛋白NSm序列不变, 建立了病毒微型基因组复制的移动体系。在拯救TSWV全长侵染性克隆时, 发现过表达病毒复制酶RdRp会强烈地干扰病毒拯救, 导致野生型基因组M RNA无法被拯救, 同时发现表达该病毒自身的抑制子NSs干扰基因组S RNA的拯救等一系列问题。该课题组通过一系列的优化, 用2×35S驱动的野生型正链S基因组RNA(S₍₊₎)、优化型负链M基因组RNA(M₍₋₎opt)、优化型正链L基因组RNA(L₍₊₎opt)和3个VSRs(P19-HcPro-γb)共浸润本氏烟叶片(图1(c)), 最终成功从全长cDNA侵染性克隆拯救出TSWV^[7]。TSWV反向遗传学体系的建立提供了对该病毒的侵染和致病机制进行深入系统的研究的关键体系, 为植物分节段负链RNA病毒未来的进一步深入研究奠定了良好的基础。

3.2.2 Emaravirus反向遗传学体系

欧洲花楸环斑病毒属(*Emaravirus*)包含9种植物分节段负义单链RNA病毒, 其基因组由4~8条负链RNAs组成, 玫瑰莲座丛病毒(rose rosette virus, RRV)是该属的一个代表成员, 含有7条基因组RNAs, 给美国的玫瑰及其产业造成严重的危害和经济损失^[41,72,73]。美国Verchot课题组^[73]于2019年在植物中成功拯救了有活性的RRV。研究人员首先通过生物合成互补正链基因组agRNA1~4, 并从病毒感染玫瑰逆转录生成的cDNA中克隆取得agRNA5~7, 分别插入植物二元表达载体而获得在35S启动子驱动下可以生成病毒7条基因组RNAs的质粒, 各基因组的3'末端从35S启动子起始第一位表达, 病毒5'末端融合到HDV RZ核酶序列。为了建立RRV微型基因组复制体系, 将agRNA5中的P5用报告基因iLOV替换获得微型基因组agR5-iLOV报告质粒。当与表达复制酶RdRp的agRNA1和核衣壳N的agRNA3在本氏烟叶片中共表达可以检测到iLOV生成的绿色荧光, 这一体系具有复制和转录活性, 成功建立了病毒微型基因组反向遗传学体系。为了建立RRV全长基因组

反向遗传学体系, 将表达agRNA1-7的7个质粒共浸润模式植物本氏烟和拟南芥叶片, 成功在植物中实现了有活性的病毒的拯救, 进一步用喷枪喷射法将携带病毒全长基因组的农杆菌导入寄主植物玫瑰中, 并成功拯救了有活性的病毒。进一步研究发现, agRNA4可以表达移动蛋白P4, 当agRNA1-4四个质粒在细胞内共表达时也可以拯救获得有侵染活性的病毒^[72,73]。

为了建立RRV携带报告基因的反向遗传学体系监测病毒的侵染和传播, 在正链基因组agRNA2中的Gn/Gc序列3'末端融合报告基因iLOV获得报告载体agR2-iLOV, 将agR1、agR3~4和agR2-iLOV等4个质粒, agR1-4、agR6-7和agR5-iLOV等7个质粒或agR1、agR3~7和agR2-iLOV等7个质粒在本氏烟中共表达(图1(d)), 均可以实现有侵染活性的病毒的拯救^[72]。Verchot课题组建立的RRV反向遗传学体系这一新的技术平台, 为研究病毒侵染机制和病害防控提供了强有力的分子工具。

4 未来展望

病毒反向遗传学体系是研究病毒基因功能、重组和改造病毒基因组的一种极为重要的分子遗传操纵技术体系。近20年来, 植物负链RNA病毒反向遗传学体系一直是领域内难以攻克的难题。随着分子生物学技术的迅速发展和研究技术的不断提升, 我国科学家相继在负链RNA病毒反向遗传学体系取得了一系列的重要突破, 首次在世界上成功建立了植物不分节段和分节段负链RNA病毒的反向遗传学体系。在未来的研究中, 建立的植物负链RNA病毒反向遗传学体系将助力病毒基因功能、复制、转录、移动、粒体装配及致病机制等病毒基础生物学问题的研究, 并为病毒与寄主互作以及寄主抗病提供崭新的病毒示踪体系, 进一步推动我国在植物负链RNA病毒研究领域走在国际同行的前列。此外, 这些反向遗传学体系也可应用于研发弱毒疫苗、表达外源蛋白和基因编辑等工具, 为病毒有益化研究提供方法和策略, 未来还可能为研究病毒基因组的表观修饰提供帮助, 并有助于作物品种抗病性鉴定等工作的开展。

参考文献

- 1 Elliott R M B G. Molecular biology of orthobunyaviruses. In: Plyusnin A, Elliott R M, eds. The Bunyaviridae: Molecular and Cellular Biology. Norwich: Horizon Scientific Press, 2011
- 2 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

- 3 German T L, Ullman D E, Moyer J W. Tospoviruses: Diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. *Annu Rev Phytopathol*, 1992, 30: 315–348
- 4 Oliver J E, Whitfield A E. The genus *Tospovirus*: Emerging bunyaviruses that threaten food security. *Annu Rev Virol*, 2016, 3: 101–124
- 5 Cao Q, Xu W Y, Gao Q, et al. Transmission characteristics of barley yellow striate mosaic virus in its planthopper vector *Laodelphax striatellus*. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1419
- 6 Lu G, Li S, Zhou C, et al. Tenuivirus utilizes its glycoprotein as a helper component to overcome insect midgut barriers for its circulative and propagative transmission. *PLoS Pathog*, 2019, 15: e1007655
- 7 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
- 8 Neumann G, Whitt M A, Kawaoka Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA—What have we learned? *J Gen Virol*, 2002, 83: 2635–2662
- 9 Racaniello V R, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*, 1981, 214: 916–919
- 10 Ahlquist P, French R, Janda M, et al. Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 7066–7070
- 11 Pekosz A, He B, Lamb R A. Reverse genetics of negative-strand RNA viruses: Closing the circle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 8804–8806
- 12 Jackson A O, Li Z. Developments in plant negative-strand RNA virus reverse genetics. *Annu Rev Phytopathol*, 2016, 54: 469–498
- 13 Lowen A C, Noonan C, McLees A, et al. Efficient bunyavirus rescue from cloned cDNA. *Virology*, 2004, 330: 493–500
- 14 Elliott R M. Orthobunyaviruses: Recent genetic and structural insights. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 673–685
- 15 Dietzgen R G C C, Kurath G, Kuzmin I V, et al. Family rhabdoviridae. In: King A M Q, Adams M J, Carstens E B, et al., eds. *Virus Taxonomy*. Oxford: Elsevier Academic Press, 2011. 686–714
- 16 Easton A J P C. Order-mononegavirales. In: King A M Q, Adams M J, Carstens E B, et al., eds. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier: Amsterdam, 2012. 653–657
- 17 Walker P J, Firth C, Widen S G, et al. Evolution of genome size and complexity in the rhabdoviridae. *PLoS Pathog*, 2015, 11: e1004664
- 18 Ball L A. Cellular expression of a functional nodavirus RNA replicon from vaccinia virus vectors. *J Virol*, 1992, 66: 2335–2345
- 19 Collins P L, Mink M A, Hill M G, et al. Rescue of a 7502-nucleotide (49.3% of full-length) synthetic analog of respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology*, 1993, 195: 252–256
- 20 Collins P L, Mink M A, Stec D S. Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of a foreign reporter gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9663–9667
- 21 De B P, Banerjee A K. Rescue of synthetic analogs of genome RNA of human parainfluenza virus type 3. *Virology*, 1993, 196: 344–348
- 22 Dimock K, Collins P L. Rescue of synthetic analogs of genomic RNA and replicative-intermediate RNA of human parainfluenza virus type 3. *J Virol*, 1993, 67: 2772–2778
- 23 Pattnaik A K, Wertz G W. Cells that express all five proteins of vesicular stomatitis virus from cloned cDNAs support replication, assembly, and budding of defective interfering particles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 1379–1383
- 24 Schnell M J, Mebatsion T, Conzelmann K K. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J*, 1994, 13: 4195–4203
- 25 Conzelmann K K, Schnell M. Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins. *J Virol*, 1994, 68: 713–719
- 26 Pattnaik A K, Wertz G W. Replication and amplification of defective interfering particle RNAs of vesicular stomatitis virus in cells expressing viral proteins from vectors containing cloned cDNAs. *J Virol*, 1990, 64: 2948–2957
- 27 Pattnaik A K, Andrew Ball L, LeGrone A W, et al. Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone. *Cell*, 1992, 69: 1011–1020
- 28 Perrotta A T, Been M D. A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis delta virus RNA. *Nature*, 1991, 350: 434–436
- 29 Collins P L, Hill M G, Camargo E, et al. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 11563–11567
- 30 Garcin D, Pelet T, Calain P, et al. A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: Generation of a novel copy-back nondefective interfering virus. *EMBO J*, 1995, 14: 6087–6094
- 31 Lawson N D, Stillman E A, Whitt M A, et al. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 4477–4481
- 32 Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, et al. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J*, 1995, 14: 5773–5784
- 33 Baron M D, Barrett T. Rescue of rinderpest virus from cloned cDNA. *J Virol*, 1997, 71: 1265–1271
- 34 Kato A, Sakai Y, Shioda T, et al. Initiation of Sendai virus multiplication from transfected cDNA or RNA with negative or positive sense. *Genes Cells*, 1996, 1: 569–579
- 35 Durbin A P, Hall S L, Siew J W, et al. Recovery of infectious human parainfluenza virus type 3 from cDNA. *Virology*, 1997, 235: 323–332

- 36 Neumann G, Feldmann H, Watanabe S, et al. Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J Virol*, 2002, 76: 406–410
- 37 Kormelink R, Garcia M L, Goodin M, et al. Negative-strand RNA viruses: The plant-infecting counterparts. *Virus Res*, 2011, 162: 184–202
- 38 Mann K S, Dietzgen R G. Plant rhabdoviruses: New insights and research needs in the interplay of negative-strand RNA viruses with plant and insect hosts. *Arch Virol*, 2014, 159: 1889–1900
- 39 Jackson A O, Dietzgen R G, Goodin M M, et al. Biology of plant rhabdoviruses. *Annu Rev Phytopathol*, 2005, 43: 623–660
- 40 Whitfield A E, Ullman D E, German T L. Tospovirus-thrips interactions. *Annu Rev Phytopathol*, 2005, 43: 459–489
- 41 Chen Y, Dessau M, Rotenberg D, et al. Entry of bunyaviruses into plants and vectors. *Adv Virus Res*, 2019, 104: 65–96
- 42 Ganesan U, Bragg J N, Deng M, et al. Construction of a Sonchus yellow net virus minireplicon: A step toward reverse genetic analysis of plant negative-strand RNA viruses. *J Virol*, 2013, 87: 10598–10611
- 43 Qian S, Chen X, Sun K, et al. Capped antigenomic RNA transcript facilitates rescue of a plant rhabdovirus. *Virol J*, 2017, 14: 113
- 44 Sun K, Zhao D, Liu Y, et al. Rapid construction of complex plant RNA virus infectious cDNA clones for agroinfection using a yeast-*E. coli*-*Agrobacterium* shuttle vector. *Viruses*, 2017, 9: 332
- 45 Zhou X, Lin W, Sun K, et al. Specificity of plant rhabdovirus cell-to-cell movement. *J Virol*, 2019, 93: e00296-19
- 46 Conti M, Appiano A. Barley yellow striate mosaic virus and associated viroplasms in barley cells. *J Gen Virol*, 1973, 21: 315–322
- 47 Makkouk K M, Ghulam W, Kumari S G. First Report of *Barley yellow striate mosaic virus* Infecting barley and wheat in Lebanon. *Plant Dis*, 2001, 85: 446
- 48 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
- 49 Gao Q, Xu W Y, 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
- 50 Gerlach P, Malet H, Cusack S, et al. Structural insights into bunyavirus replication and its regulation by the vRNA promoter. *Cell*, 2015, 161: 1267–1279
- 51 Abudurexiti A, Adkins S, Alioto D, et al. Taxonomy of the order Bunyvirales: Update 2019. *Arch Virol*, 2019, 164: 1949–1965
- 52 Wandzik J M, Kouba T, Karuppusamy M, et al. A structure-based model for the complete transcription cycle of influenza polymerase. *Cell*, 2020, 181: 877–893.e21
- 53 Dunn E F, Pritlove D C, Jin H, et al. Transcription of a recombinant bunyavirus RNA template by transiently expressed bunyavirus proteins. *Virology*, 1995, 211: 133–143
- 54 Lopez N, Muller R, Prehaud C, et al. The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules. *J Virol*, 1995, 69: 3972–3979
- 55 Bridgen A, Elliott R M. Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 15400–15404
- 56 Acrani G O, Tilston-Lunel N L, Spiegel M, et al. Establishment of a minigenome system for Oropouche virus reveals the S genome segment to be significantly longer than reported previously. *J Gen Virol*, 2015, 96: 513–523
- 57 Flick R, Pettersson R F. Reverse genetics system for *Uukuniemi virus* (Bunyaviridae): RNA polymerase I-catalyzed expression of chimeric viral RNAs. *J Virol*, 2001, 75: 1643–1655
- 58 Flick R, Flick K, Feldmann H, et al. Reverse genetics for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Virol*, 2003, 77: 5997–6006
- 59 Blakqori G, Weber F. Efficient cDNA-based rescue of La Crosse bunyaviruses expressing or lacking the nonstructural protein NSs. *J Virol*, 2005, 79: 10420–10428
- 60 Ikegami T, Won S, Peters C J, et al. Rescue of infectious rift valley fever virus entirely from cDNA, analysis of virus lacking the NSs gene, and expression of a foreign gene. *J Virol*, 2006, 80: 2933–2940
- 61 Ogawa Y, Sugiura K, Kato K, et al. Rescue of Akabane virus (family Bunyaviridae) entirely from cloned cDNAs by using RNA polymerase I. *J Gen Virol*, 2007, 88: 3385–3390
- 62 Billecocq A, Gauliard N, Le May N, et al. RNA polymerase I-mediated expression of viral RNA for the rescue of infectious virulent and avirulent Rift Valley fever viruses. *Virology*, 2008, 378: 377–384
- 63 Brennan B, Li P, Zhang S, et al. Reverse genetics system for severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J Virol*, 2015, 89: 3026–3037
- 64 Neumann G, Watanabe T, Ito H, et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9345–9350
- 65 Wagner E, Engelhardt O G, Gruber S, et al. Rescue of recombinant Thogoto virus from cloned cDNA. *J Virol*, 2001, 75: 9282–9286
- 66 Flatz L, Bergthaler A, de la Torre J C, et al. Recovery of an arenavirus entirely from RNA polymerase I/II-driven cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 4663–4668

- 67 Neumann G, Kawaoka Y. Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004, 283: 43–60
- 68 Prins M, Goldbach R. The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends Microbiol*, 1998, 6: 31–35
- 69 Pappu H R, Jones R A C, Jain R K. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Res*, 2009, 141: 219–236
- 70 Walker P J, Siddell S G, Lefkowitz E J, et al. Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Arch Virol*, 2019, 164: 2417–2429
- 71 Ishibashi K, Matsumoto-Yokoyama E, Ishikawa M. A tomato spotted wilt virus S RNA-based replicon system in yeast. *Sci Rep*, 2017, 7: 12647
- 72 Pang M X, Mathieu G, Kelsey L, et al. Infectious DNA clone technology and inoculation strategy for Rose Rosette Virus that includes all seven segments of the negative-strand RNA genome. *bioRxiv*, 2019, doi: 10.1101/712000
- 73 German T L, Lorenzen M D, Grubbs N, et al. New technologies for studying negative-strand RNA viruses in plant and arthropod hosts. *Mol Plant Microbe Interact*, 2020, 33: 382–393

Summary for “植物负链RNA病毒反向遗传学体系前沿研究进展”

Advances in reverse genetics system of plant negative-strand RNA viruses

Mingfeng Feng¹, Zhike Feng¹, Zhenghe Li^{2*}, Xianbing Wang^{3*} & Xiaorong Tao^{1*}

¹ Key Laboratory of Plant Immunity, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

² State Key Laboratory of Rice Biology, Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

³ College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China

* Corresponding authors, E-mail: lizh@zju.edu.cn; wangxianbing@cau.edu.cn; taoxiaorong@njau.edu.cn

Negative-strand RNA (NSR) viruses contain not only medical important animal pathogens but also agricultural important plant pathogens. These NSR viruses cause deadliest diseases in humans, livestock and agronomic crops and pose great threat to the health of human being and food security worldwide. The virus reverse genetics system is an important molecular genetic technology to study viral gene functions in virus infection cycle, disease pathology and virus-host interactions. For animal-infecting NSR viruses, the reverse genetics system has been established for more than twenty years. In contrast to the well-established reverse genetics systems for animal-infecting NSR viruses, establishment of such system for the plant-infecting NSR viruses turned out to be an extremely challenge work. Many research groups throughout the world have tried to use the similar strategies used for animal NSR viruses to establish reverse genetics systems for plant-infecting NSR viruses in the last twenty years but none of groups have succeeded. The absence of the reverse genetics system posed a major obstacle to molecular genetic manipulation and subsequent investigation of gene function and disease pathology for plant-infecting NSR viruses. Recently, big breakthroughs have been made in the establishment of the reverse genetics systems for plant NSR viruses by scientists from China and America, respectively. The systems were recently established for both nonsegmented and segmented plant NSR viruses. The reverse genetics system for a nonsegmented plant NSR virus was firstly developed for sonchus yellow net virus (SYNV), a non segmented nucleorhabdovirus NSR. Using the similar strategies as SYNV, barley yellow striate mosaic virus (BYSMV), a nonsegmented cytorhabdovirus NSR, was then succeeded in the establishment of reverse genetics system. The first reverse genetics system for a segmented plant NSR virus was developed using tomato spotted wilt virus (TSWV), a tospovirus with tripartite negative-stranded/ambisense RNA genomes. The reverse genetics system was also recently developed for rose rosette virus (RRV), an emaravirus with seven negative-sense mono-cistronic RNA genomes. The establishment of the reverse genetics system for plant NSR viruses typically involves two steps. The first step requires the construction of a mini-genome replication system. The viral genomic or antigenomic RNA was flanked by hammerhead and ribozyme to generate exact viral 5' and 3' end, and driven by 35S promoter. The mini-replicon construct was co-expressed with the constructs expressing nucleocapsid (N) protein, phosphoprotein (P; essential for rhabdovirus) and viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). For the segmented plant NSR viruses such as TSWV, codon optimization and removal of intron-splicing sites of RdRp sequence are critical for the expression of a functional RdRp from 35S-driven constructs *in planta*. The second step involves the rescue of virus entirely from full-length infectious cDNA clones in plant. The recombinant virus can carry green fluorescence protein (GFP) gene reporter and infect *Nicotiana benthamiana* plant systemically. The establishment of reverse genetics for different plant-infecting NSR viruses now provided powerful systems to investigate all aspects of virus infection cycle and disease pathology. The recent breakthroughs of reverse genetics systems have opened a new era for the investigation of plant-infecting NSR viruses in the future.

plant negative-strand RNA virus, reverse genetics system, virus infectious clone, virus rescue

doi: [10.1360/TB-2020-0671](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0671)