

# CRISPR/Cas9 系统在培育抗病毒植物新种质中的应用

张道微<sup>1</sup>, 张超凡<sup>1,2</sup>, 董芳<sup>2</sup>, 黄艳岚<sup>1</sup>, 张亚<sup>1</sup>, 周虹<sup>1</sup>

1. 湖南省作物研究所, 长沙 410125;

2. 中南大学研究生院隆平分院, 长沙 410125

**摘要:** 随着 CRISPR/Cas9 系统在基因组编辑技术上的开发和完善, CRISPR/Cas9 系统在应用于动物病毒感染性疾病防治并取得相当成效的同时, 也逐步被应用到对植物病毒基因组进行高效靶向修饰的研究中。CRISPR/Cas9 系统对基因组靶向修饰作用不仅实现了对植物 DNA 病毒基因组序列的编辑, 还展示了其有效作用于植物 RNA 病毒基因组的潜力, 同时 CRISPR/Cas9 系统还能在基因转录和转录后调控水平发挥作用, 说明该系统具有通过多种途径调控植物病毒复制的潜能。相对其他植物病毒病防治策略, 该系统对病毒基因组的编辑更精准、对基因表达的调控更稳定, 对病毒病的抗性也更为广谱。本文将 CRISPR/Cas9 系统与其他植物病毒病防治策略进行了比较, 概述了该系统在培育植物抗病毒病新种质中的优势, 分析了其具体应用在该领域中面临的主要问题, 讨论了该系统在培育抗病毒植物新种质应用中的发展趋势。

**关键词:** CRISPR/Cas9 系统; 病毒病防治; 基因组靶向修饰

## Application of CRISPR/Cas9 system in breeding of new antiviral plant germplasm

Daowei Zhang<sup>1</sup>, Chaofan Zhang<sup>1,2</sup>, Fang Dong<sup>2</sup>, Yanlan Huang<sup>1</sup>, Ya Zhang<sup>1</sup>, Hong Zhou<sup>1</sup>

1. Hunan Crop Research Institute, Changsha 410125, China;

2. Longping Branch of Graduate School of Central South University, Changsha 410125, China

**Abstract:** With the development and improvement of CRISPR/Cas9 system in genomic editing technology, the system has been applied to the prevention and control of animal viral infectious diseases, which has made considerable achievements. It has also been applied to the study of highly efficient gene targeting editing in plant virus genomes. The CRISPR/Cas9-mediated targeted gene modification has not only achieved the genome editing of plant DNA virus, but also showed the genome editing potential of plant RNA virus. In addition, the CRISPR/Cas9 system functions at the gene transcriptional and post-transcriptional level, indicating that the system could regulate the replication of plant viruses through different ways. Compared with other plant viral disease control strategies, this system is more accurate in genome editing, more stable in gene expression regulation, and has broader spectrum of resistance

收稿日期: 2016-04-18; 修回日期: 2016-05-09

基金项目: 国家甘薯产业技术体系项目(编号: CARS-11-C-16) 和湖南省旱粮产业技术体系(病虫害防控岗位)项目资助[Supported by China Agriculture Research System of Sweet Potato (No. CARS-11-C-16) and Agriculture Research System of Upland Crops in Hunan Province (the Post of Prevention and Control of Pest and Disease)]

作者简介: 张道微, 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向: 甘薯育种与甘薯病毒病防治。E-mail: zhang000048@126.com

通讯作者: 张超凡, 博士研究生, 研究员, 研究方向: 甘薯育种与栽培。E-mail: cfzhang2004@sina.com

DOI: 10.16288/j.yczs.16-134

网络出版时间: 2016/7/27 14:36:47

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160727.1436.001.html>

to virus disease. In this review, we summarized the advantages, main problems and development tendency of CRISPR/cas9 system in breeding of new antiviral plant germplasms.

**Keywords:** CRISPR/Cas9 System; virus disease prevention and control; genome targeting modification

病毒病害影响植物生长, 给农业生产带来严重危害。我国植物病毒病影响农业生产的问题日趋严重, 尤其是以营养器官繁殖为主的薯类等作物携带的病毒, 具有传播迅速、感染面大、严重减产等特点<sup>[1,2]</sup>。甘薯病毒病频发于广东、江苏、四川、安徽等主要甘薯产区<sup>[3]</sup>, 甘薯病毒病 SPVD(Sweet potato virus diseases)可导致甘薯地上部丛生和矮化、叶面积指数降低, 并影响细胞内超氧化物歧化酶(SOD)等酶活性, 损伤细胞, 从而导致生物产量降低, 影响甘薯产量<sup>[4]</sup>。马铃薯病毒病在我国马铃薯主产区传播迅速, 大田病毒病检出率高, 多种病毒复合侵染, 成为马铃薯减产的主要因素<sup>[1]</sup>。作物病毒病害对农业生产的影响逐年凸显, 病毒病防治策略的研究已成为现代农业生产过程中不可或缺的工作。

目前已经出现一系列针对作物病毒病发作特性的防治措施, 但这些措施都难以达到理想的防治效果。有效控制传播媒介生物量能降低病毒病区域内传播的速率, 但难以实现对病毒病的完全抑制<sup>[5]</sup>; 化学或生物农药应用能缓解病毒病对农作物造成的危害, 但农药会对植株本身和周围环境造成不利影响<sup>[6,7]</sup>; 脱毒苗培育及脱毒良种繁育推广能有效控制病毒病的传播, 但目前应用成本相对偏高<sup>[2]</sup>; 作物抗性基因发掘与利用为植物病毒病防治提供了新思路, 但目前应用上仍存在很大局限。转基因技术日渐成熟, 为植物抗性基因的开发和利用提供了捷径, 而抗性基因的选择是问题的关键。

现有转基因抗病毒育种策略普遍选择单一的抗病毒作用位点来干扰病毒的正常复制, 存在明显的局限性。CRISPR/Cas9 系统主要在原核生物防御病毒入侵过程中发挥作用, 由于该系统对核苷酸序列存在优异的编辑能力, 目前已广泛应用于真核生物核苷酸序列编辑。而该系统在真核生物细胞内也能有效作用于病毒基因组, 干扰病毒的正常复制, 有助于实现病毒的清除和防御, 且不易受宿主本身防御系统和病毒反防御机制的干扰, 相对于现有转基因抗病毒育种策略存在多方面的优势, 为抗病毒基

因的选择提供了理想的素材。本文概述了 CRISPR/Cas9 系统干扰植物病毒复制的作用机制, 探讨了该系统在植物病毒病防治中的应用前景。

## 1 当前植物转基因抗病毒育种的局限性

植物对病毒病的免疫能力非常有限, 且自身抗病毒基因较缺乏、利用难度大、开发周期长。根据植物病毒复制与宿主 RNAi 抗病毒主要过程(图 1), 人们已提出许多有效的转基因抗病毒策略<sup>[8]</sup>, 这些策略主要选择病毒衣壳蛋白、病毒复制酶、病毒依赖的宿主转运蛋白和宿主 RNAi 等位点作为抗病毒的靶位点, 结合转基因技术干扰这些靶位点的功能来调控植物病毒的正常生命周期, 在改良植物的抗病性上取得了显著成效。例如美国批准商业化种植的转基因番木瓜, 解决了长期困扰番木瓜生产的环斑病毒病问题, 给农业生产带来了经济效益和社会效益<sup>[9]</sup>。

但是这些方法及策略也存在明显的局限性<sup>[10]</sup>, 表 1 分析了几种转基因抗病毒策略的作用效果和不足。转基因表达衣壳蛋白对裸露的 RNA 病毒无效, 且只作用于病毒发病早期的侵染过程<sup>[11]</sup>, 同时会导致异缘包壳<sup>[12]</sup>、重组<sup>[13]</sup>、协生<sup>[14]</sup>等现象的发生。复制酶介导的抗性途径对病毒具有持久抗性, 但作用范围相对较窄, 具有高度株系特异性<sup>[15]</sup>。运动蛋白主要作用于病毒侵染的中晚期, 且表达功能完整的转运蛋白 MP 还能提高植物对病毒的敏感性<sup>[16]</sup>。

RNAi 介导的抗病毒途径抗病能力强, 作用靶位点选择范围广, 但存在脱靶等现象<sup>[17]</sup>。多数病毒已经进化产生相应的反防御机制, 通过编码 RNAi 抑制子, 在不同阶段以不同方式来打破宿主 RNAi 造成的抑制作用, 抵御宿主防御<sup>[18]</sup>。如甘薯褪绿矮化病毒(Sweet potato chlorotic stunt virus, SPCSV)能编码 RNase S 和 p22 这两个蛋白因子来干扰宿主 RNAi 的正常功能<sup>[19]</sup>。而许多植物内源的抗性基因在植物病毒病防御过程中也存在正反两方面的作用, 阻碍了抗性基因的直接开发与利用。如抗番茄黄化曲叶

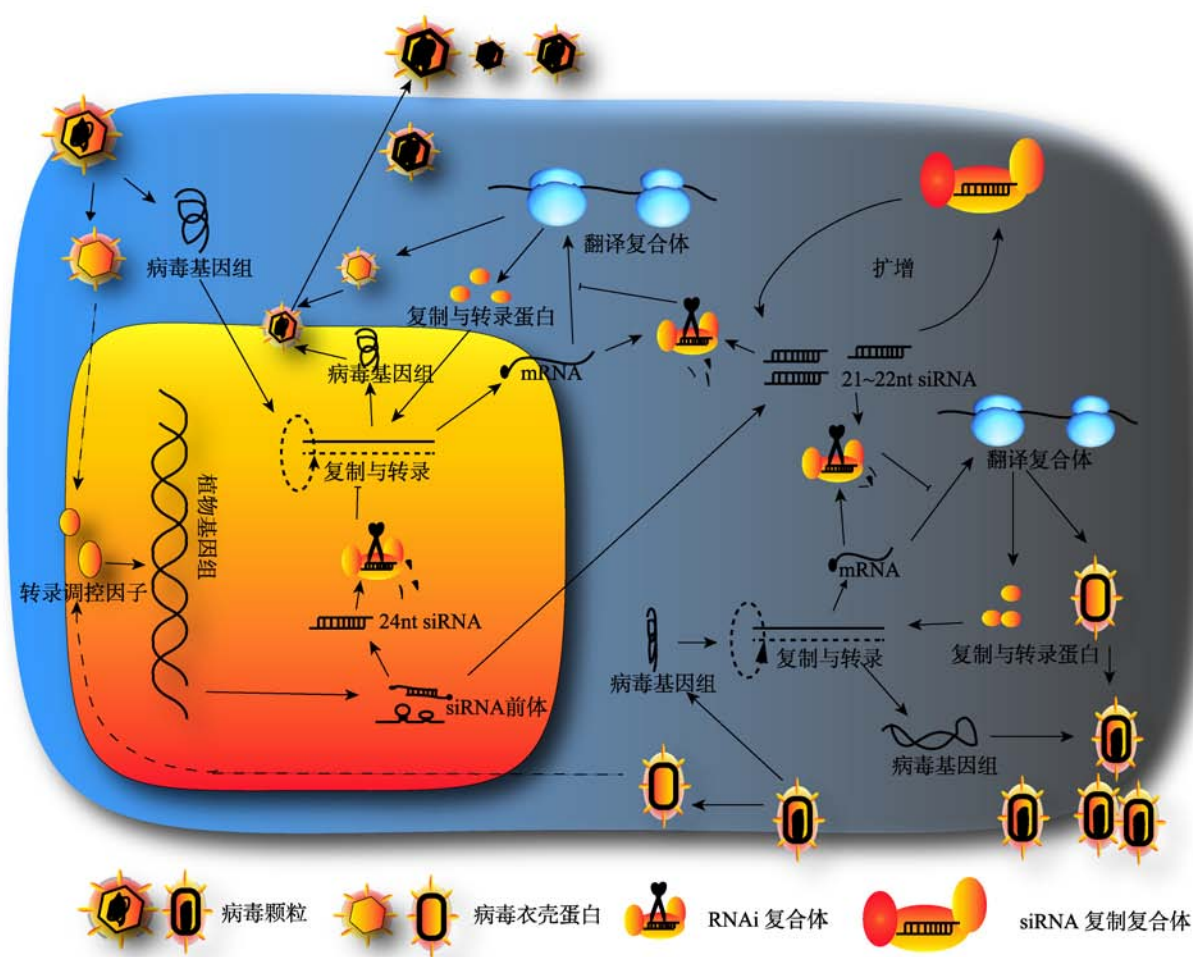


图 1 植物病毒复制与宿主 RNAi 抗病毒主要过程

Fig. 1 Main process of plant virus replication and RNAi resistant to virus in host cell

图中所示不包括反转录病毒复制过程。

表 1 几种植物病毒病防治的转基因策略分析

Table 1 Analysis of some transgenic strategies for the prevention of plant virus diseases

转基因对象	作用位点	作用阶段与效果	作用范围	存在的问题
衣壳蛋白	病毒去组装	早期侵染阶段，抑制病毒去组装，推迟发病，延缓病症	有衣壳的病毒，对裸露 RNA 病毒等无效	发生异缘包壳、重组、协生等作用，不能抵御反复感染
复制酶	病毒复制酶、RNA 调控	病毒复制期，抑制病毒复制，产生持续较强抗性	与该复制酶功能相关的病毒	作用范围狭窄，植株特异性显著
转运蛋白	病毒组装和运输	中晚期阶段，抑制病毒组装运输，延缓和抑制症状	多个属和种的病毒	缺陷或异源 MP 才起作用，功能完整的 MP 增强植株敏感
RNAi	病毒基因组转录、翻译	合成功能大分子阶段，抑制病毒基因表达，抑制和延缓症状	具有同源核苷酸序列的相关病毒	易被病毒 RNAi 抑制子抑制失去效果
CRISPR/Cas9	病毒基因组任一核苷酸位点	去组装后核苷酸裸露阶段，抑制病毒复制，破坏病毒核苷酸序列	单一靶位点作用类似 RNAi，串联靶位点作用多类病毒	作用靶位点不合适将诱导病毒产生新突变

病毒(Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)的抗性基因 *Ty-1* 为植物 RNAi 通路成员,能使病毒 DNA 的一部分区域超甲基化而抑制病毒的复制和转录,但这种抗性有其致命的弱点,如果植物同时感染了另外一种 RNA 病毒—黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic cucumovirus, CMV),这种抗性机制就受到干扰而导致植物抗病毒防御机制的损害<sup>[20]</sup>。因此选择更合适的干扰靶位点,成为转基因抗病毒策略突破瓶颈限制的关键。而通过病毒基因组定向修饰,能筛选出更多最直接有效的靶位点,有助于打破原有策略的局限。

## 2 CRISPR/Cas9 系统与病毒感染性疾病防治

病毒基因组定向修饰,如同计算机程序源代码编辑一样,一直都是病毒病防治过程中科学家们梦寐以求的技术。尽管近年来类转录激活效应子(TALEN)等技术的出现有效填补了这一空白,但是因其识别位点有限、脱靶几率高、操作过程复杂、实施成本高等原因,在应用上存在很大局限性<sup>[21]</sup>。具有革命性的基因编辑技术 CRISPR/Cas9 系统因操作简单、实施成本低,且随着技术的改进有效降低了脱靶作用,拓宽了对基因组的作用范围,比类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)介导的基因组定点修饰技术有更为强大的应用功能。

CRISPR/Cas9 系统源于原核生物广泛存在的免疫机制,主要参与原核生物对噬菌体或质粒入侵的防御<sup>[22, 23]</sup>。在该系统中,由 CRISPR 区转录产生一种被称作 crRNA(CRISPR RNA)的 RNA 分子,crRNA 利用它的一部分序列与另一种被称作 tracrRNA 的 RNA 分子通过碱基配对结合在一起,形成嵌合 RNA(tracrRNA/crRNA),嵌合 RNA 借助 crRNA 的另一部分序列与靶 DNA 位点进行碱基配对,同时这种嵌合 RNA 能够募集具有核酸酶活性的 Cas9 蛋白结合到识别的 DNA 靶位点上并进行切割<sup>[24]</sup>,被切割的 DNA 在被宿主细胞 DNA 修复机制修复时会产生靶位点区核苷酸插入或缺失等突变<sup>[25]</sup>,从而实现基因组定点编辑。在实际应用时,可将 tracrRNA 和 crRNA 融合在一起形成单向导 RNA(Single guide RNA, sgRNA),用来引导 Cas9 酶结合到靶 DNA 序列上<sup>[26]</sup>。Cas9 与 sgRNA 一起又被称作 Cas9/sgRNA

系统,已经被多个实验室用作基因组定点编辑的工具。然而本系统的用途,不只限于基因组的靶向编辑,还可开发出更多基因操作工具<sup>[27]</sup>。

近年以来,CRISPR/Cas9 系统在病毒研究领域有了很多新的应用,其在动物界抗病毒治疗上的突破更为显著,目前通过该系统已实现对动物病毒基因组的定向编辑来干扰病毒的正常复制和功能蛋白的表达。将表达靶序列的 CRISPR/Cas9 载体转入被单纯疱疹病毒(双链 DNA 病毒)感染的动物细胞,能够引起病毒基因组 DNA 双链的断裂,从而导致病毒基因组的插入或缺失突变,实现病毒基因组定向修饰<sup>[28]</sup>。构建表达靶向 *HIV-1LTR U3* 启动子的 CRISPR/Cas9 载体,转染整合有单轮次感染的 HIV(逆转录 RNA 病毒)基因的小胶质细胞和 T4 细胞,发现 Cas9 能够消除整合的病毒基因组,通过在 *HIV-1LTR U3* 启动子区的靶向修饰对 HIV 复制产生抑制作用<sup>[29]</sup>。将携带有 HBV 的载体和表达靶向 HBV(双链 DNA 病毒)序列的 CRISPR/Cas9 载体同时转染 Huh7 细胞和 293T 细胞,检测发现 HBV 核心蛋白和表面蛋白的表达量明显降低,有效调控了 HBV 功能蛋白的正常表达<sup>[30]</sup>。将表达靶向 EBV 病毒(DNA 病毒)序列的 CRISPR/Cas9 载体转染 EBV 病毒阳性的淋巴瘤细胞系,EBV 基因组序列被编辑且细胞内 EBV 含量受抑制而明显减少<sup>[31]</sup>。

## 3 CRISPR/Cas9 系统在植物病毒病防治中的应用

相对于动物病毒感染性疾病防治的应用,CRISPR/Cas9 系统在植物病毒病防治上的应用起步稍晚,但已取得一定的研究进展。目前已经证明 CRISPR/Cas9 系统对植物 DNA 病毒存在抑制作用。Cas9/sgRNA 在烟草中表达后能够有效抑制番茄黄化卷叶病毒(单链 DNA 病毒)在烟草细胞中的侵染和复制。对于植物双生病毒,sgRNA 靶向病毒复制起始位点(IR)区对病毒侵染抑制效果比靶向 CP 或者 Rep 编码区的抑制效果更强<sup>[32]</sup>,说明对病毒基因组一些非编码区的定向编辑能获得更好的抑制效果。中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞研究组在拟南芥和烟草中表达 Cas9/sgRNA,验证了其对甜菜曲顶病毒(单链 DNA 病毒)的抑制作用,并发现在



sgRNA 的引导下, Cas9 能够引起植物病毒多个关键功能区(如 IR 区)核苷酸序列的删减或突变<sup>[33]</sup>, 而这种作用对菜豆黄矮病毒(单链 DNA 病毒)同样有效<sup>[34]</sup>, 体现了该系统对植物 DNA 病毒的作用能力具有普遍适用性。虽然尚无 CRISPR/Cas9 系统对植物 RNA 病毒作用的直接证明, 但是已有实验证明 Cas9/sgRNA 系统在 gRNA 的引导下对 RNA 的识别作用<sup>[35]</sup>, 并在人体细胞中证实了其对 RNA 的切割能力<sup>[36]</sup>。在人肝癌细胞表达 Cas9/rgRNA 系统能够抑制人类丙型肝炎病毒(单链 RNA 病毒)的侵染和复制, 设计专一靶向 HCV 的 5'UTR 序列及 3'UTR 序列等位点的 rgRNA 能够结合到 FnCas9 蛋白酶上, 并引导 FnCas9 蛋白酶直接识别和作用于 HCV 序列, 且这种识别位点并不依赖 sgRNA 保守的 PAM 基序结构<sup>[37]</sup>, 说明 Cas9/sgRNA 系统同样可以作用于 RNA 病毒基因组。

Cas9/sgRNA 系统源于原核生物病毒防御系统, 在病毒防御应用中具有独到优势。由于同一属种的病毒基因组序列拥有一些高度保守的核苷酸序列<sup>[38]</sup>, 如双生病毒科 ssDNA 合成起始于基因间隔区的一段保守序列 TAATATT/AC<sup>[39]</sup>, 这些序列位于非转录区, 很难用 RNAi 技术做到对这些位点的干扰。在病毒基因组的这些区域选择最有效的作用靶位点, 设计单一 sgRNA 可识别和作用于基因组同源性较高的多个病毒种, 而实现广谱抗病毒病效果, 具有重要应用价值, 但目前尚无研究报导。此外根据 CRISPR 序列的特性, 在同一个载体中串联表达多个靶位点识别序列, 对多个病毒属的病毒同时产生抑制效果, 从而使作物具备更为广谱的抗病毒病性能。同时由于 Cas9/sgRNA 系统完全独立于病毒自我复制环节和宿主植物病毒防御机制, 不易受病毒反防御机制的干扰, 其作用性能比 RNAi 等技术更稳定。

CRISPR/Cas9 系统相对于其他策略存在独到的优势, 但是在抗病毒应用上仍存在一定的缺陷。由于该系统易对基因组靶位点造成单点突变, 病毒基因组能有效适应这种突变造成的干扰而导致新突变。利用 CRISPR/Cas9 系统对 HIV 病毒基因组进行靶向修饰, 发现 CRISPR/Cas9 系统在抑制 HIV 复制的同时, 也导致了病毒被识别的靶位点序列的突变, 突变后的病毒能逃避 CRISPR/Cas9 系统的抑制作用,

从而导致耐受性的产生, 这将增加病毒突变的风险, 新产生的病毒将使情况更为复杂<sup>[40]</sup>。如何选择 CRISPR/Cas9 系统合适的作用靶位点以减少病毒突变的风险, 或者改良 CRISPR/Cas9 系统对核苷酸序列的作用能力, 实现病毒基因组的大片段删除, 将成为 CRISPR/Cas9 系统应用于病毒病防治的关键问题。利用 CRISPR/Cas9 系统对人类基因组内源反转录病毒基因选择性片段删除的成功操作, 为实现病毒基因组大片段删除展示了很好的应用前景<sup>[41]</sup>。此外噬菌体或者细菌能产生一些抑制子来抵御原核生物 CRISPR/Cas9 系统的防御<sup>[42, 43]</sup>, 虽然目前尚无动植物病毒或者相应宿主细胞存在类似干扰 CRISPR/Cas9 系统功能因子的研究和报导, 但是已有研究指出细胞对 CRISPR/Cas9 系统产生一种不容忽视的应答<sup>[44]</sup>, 是该系统应用于病毒病防治应充分借鉴的。

#### 4 CRISPR/Cas9 系统在培育植物抗病毒新种质中的应用前景

CRISPR/Cas9 系统广泛存在于原核生物中, 甚至一些超级病毒 Mimivirus 也拥有类似的防御系统<sup>[45]</sup>, 说明该系统在自然界的广泛适应性。目前 CRISPR/Cas9 系统应用领域很多, 随着人们对该系统研究的深入, 这些应用领域将为植物病毒病防治提供更多有效工具和思路(图 2)。

理论上 CRISPR/Cas9 系统能够识别并结合整个基因组序列任何位点, 具有优异的序列识别能力, 利用这种识别能力, CRISPR/Cas9 系统可被开发用于病毒辅助检测。美国哈佛大学维斯生物启发工程研究所 James Collins 团队利用 CRISPR/Cas9 系统辅助筛选, 开发出能区别单核苷酸突变病毒株系的寨卡病毒(单链 RNA 病毒)快速检测试纸, 缩减了 RNA 病毒检测的时间和成本<sup>[46]</sup>。该设计通过特异性 RNA 序列的筛选, 在加入基于 CRISPR/Cas9 系统的检测步骤后, 增强了病毒检测的准确性和灵敏度, 不仅能够用于检测寨卡病毒, 同样适用于埃博拉病毒、SARS 冠状病毒、流感病毒等 RNA 类型的病毒。在作物脱毒繁育应用过程中, 脱毒效果检测是决定脱毒苗质量的关键步骤, 目前国内外主要采用基于抗体抗原反应的血清学检测方法、基于 PCR 的分子生

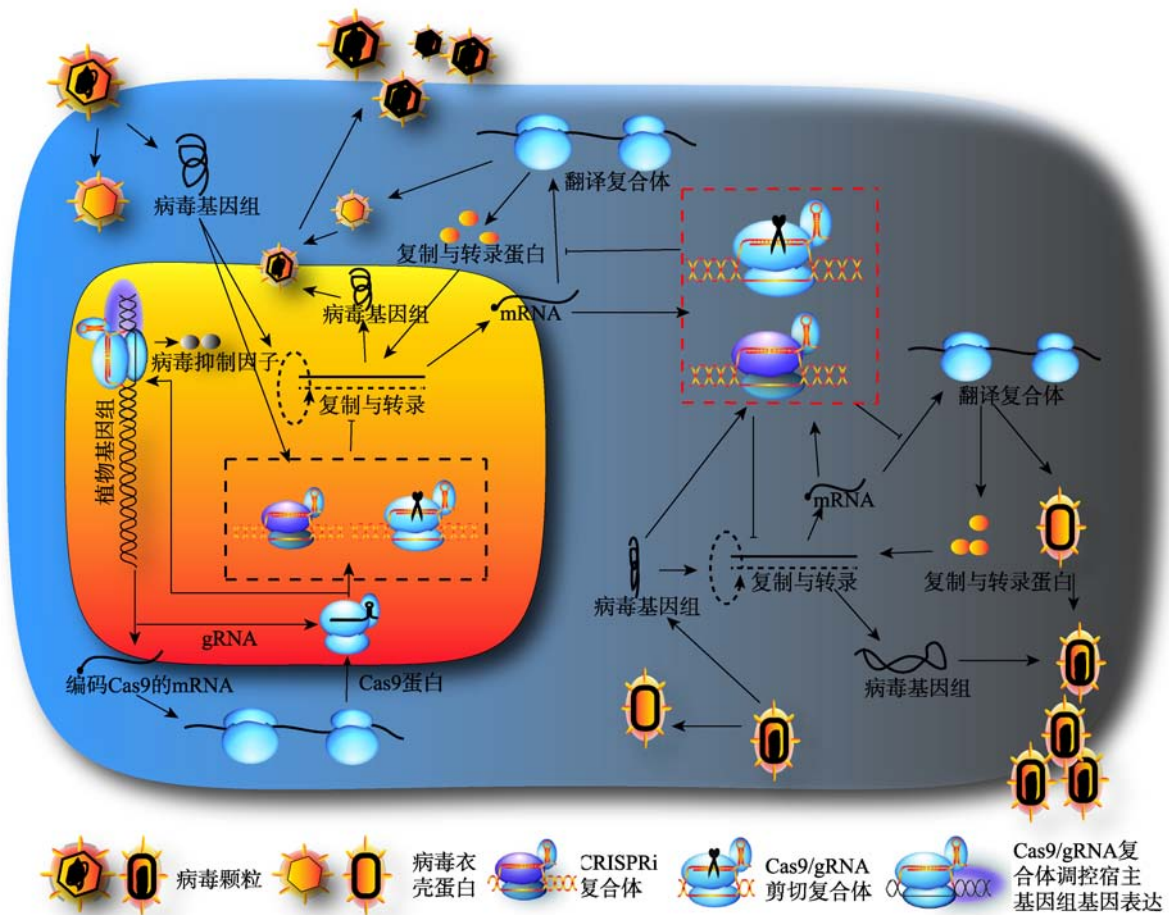


图 2 基于 CRISPR/Cas9 系统的病毒病防治主要策略

Fig. 2 The main strategy of virus disease prevention based on CRISPR/Cas9 system

图中所示 gRNA 指 sgRNA 和 rgRNA。

物学检测方法和基于分子杂交的检测方法，但是三者都存在明显局限性<sup>[47]</sup>，利用 CRISPR/Cas9 系统辅助筛选的设计为病毒检测技术提供了新思路，具有重要应用价值。

CRISPR/Cas9 系统对基因转录和转录后水平的调控也有广泛的应用前景。病毒感染后，宿主细胞许多抗病毒因子不能正常表达，诱导宿主抗病毒因子的表达也是抑制病毒复制的有效途径。基于 CRISPR/Cas9 系统靶向识别功能构建 Cas9 与转录激活因子的融合蛋白，通过这类方法产生的融合蛋白能非常稳定地结合到靶位点上，调控基因表达却无需切割靶位点核苷酸序列<sup>[48]</sup>，能更准确、更高效地对基因的表达进行调控，可实现宿主抗病毒因子的基因表达调控，打破病毒抑制因子对植物抗性基因表

达的抑制作用。基于该系统开发的 CRISPRi 技术，能将该系统对靶序列的识别、结合功能与基因表达抑制因子的抑制表达功能融合，高效关闭或沉默靶基因的表达，从而实现病毒基因转录或转录后的表达调控<sup>[49]</sup>，干扰病毒功能基因的正常表达，且有效避免了病毒基因组突变造成的风险，在基因转录水平调控中有重要应用价值。

此外，CRISPR/Cas9 系统在原核生物中具有识别和清除异源核苷酸序列的功能，并能捕获外源核苷酸序列，将其整合到自身基因组 CRISPR 区，从而具有免疫记忆功能和获得性免疫的能力。最近发现名为 *Marinomonas mediterranea* (MMB-1) 的细菌捕获病原体 RNA 片段后，能利用 RT-Cas1 融合蛋白以一种逆转录依赖型方式，结合 Cas2 将这些 RNA 片

段整合到自身基因组 CRISPR 序列中,这种识别和破坏病毒的系统类似于捕获外源 DNA 的 CRISPR/Cas9 系统<sup>[50]</sup>。如何开发这类获得性免疫系统,使表达该系统的转基因植物拥有获得性免疫力,将更有效地解决病毒病广谱抗性的问题。

## 5 结语与展望

CRISPR/Cas9 系统由于其对基因组稳定的编辑能力,目前已经被全球各个生物学实验室广泛使用。利用该系统既可完成基因功能的修改<sup>[51]</sup>,又可以有效地实现基因功能缺失的操作<sup>[52]</sup>。虽然韩国基础科学研究院证实了 CRISPR/Cpf1 系统应用于基因组精确编辑几乎不存在脱靶效应<sup>[53, 54]</sup>,但是在培育植物抗病毒病新种质资源的应用中,CRISPR/Cas9 系统主要存在 3 方面的问题:(1)需进一步提升 CRISPR/Cas9 系统对基因组的编辑能力,以应对病毒自身对点突变的逃逸作用,避免病毒病抗性的削弱或丧失的风险;(2)急需拓宽抗病毒的广谱性,以应对多种病毒病共同侵染,解决转基因抗病毒策略中抗性单一的问题;(3)需建立作用于 RNA 病毒的 CRISPR/Cas9 成熟系统,以应对 RNA 病毒的侵染,增加作物对 RNA 病毒的抗性。

刘耀光课题组利用 CRISPR/Cas9 系统构建多重 sgRNA 表达载体,能同时对作物基因组多个基因进行编辑,将成为该系统应用于作物转基因抗病毒病策略的主要方向<sup>[55]</sup>。在同一个载体中串联表达靶向基因组多个位点的 sgRNA,既能通过作用于基因组临近两个靶位点的 sgRNA 实现基因组片段的删除<sup>[56]</sup>,提升该系统对病毒基因组的编辑能力,又能通过多基因位点的编辑<sup>[55]</sup>,实现同时对多种病毒基因组的编辑,提升该系统抗病毒的广谱性。

在已发现的几百种植物病毒中, RNA 病毒所占比例达 93.9%<sup>[57]</sup>,要提升作物广谱抗病毒能力,必然要解决植物对 RNA 病毒的抗性。虽然 CRISPR/Cas9 系统对 RNA 病毒的应用体系尚未成熟,但目前已经证实 CRISPR/Cas9 系统对 RNA 序列的编辑能力,张锋等<sup>[36]</sup>开发出仅作用于 RNA 的 CRISPR/Cas9 系统。而 CRISPRi 等技术的开发,同样能有效实现 RNA 病毒基因组基因的表达调控,将极大丰富 CRISPR/Cas9 系统作用的植物病毒种类。

此外对 CRISPR/Cas9 系统免疫记忆机制的研究,将为该系统应用于植物抗病毒病种质资源创制提供更完美的解决方案。该系统已被开发应用于病毒辅助检测<sup>[46]</sup>,同时也被应用成一种用于长期记录活细胞中分子时间的方法<sup>[58]</sup>,为创制具有 CRISPR/Cas9 系统免疫记忆机制的植物新种质奠定了研究基础。

## 参考文献(References):

- [1] Fan GQ, Bai YJ, Gao YL, Zhang W, Zhang S, Shen Y, Liu K, Yu J. Investigation and analysis on potato viral disease in China. *J Northeast Agric Univ*, 2013, 44(7): 74–79.  
范国权, 白艳菊, 高艳玲, 张威, 张抒, 申宇, 刘凯, 喻江. 中国马铃薯主要病毒病发生情况调查与分析. 东北农业大学学报, 2013, 44(7): 74–79. [DOI]
- [2] Song BF, Wang SW, Xie KY, Yang YJ, Yang CL, Zhang HL, Li RG, Xing JX, Wu JY, Guo XD, Meng Q, Zhang LM. Status and prospects of sweetpotato viruses elimination in China. *Scientia Agric Sinica*, 1997, 30(6): 43–48.  
宋伯符, 王胜武, 谢开云, 杨永嘉, 杨崇良, 张鹤龄, 李汝刚, 邢继英, 邬景禹, 郭小丁, 孟清, 张立明. 我国甘薯脱毒研究的现状及展望. 中国农业科学, 1997, 30(6): 43–48. [DOI]
- [3] Qiao Q, Zhang ZC, Zhang DS, Qin YH, Tian YT, Wang YJ. Serological and molecular detection of viruses infecting sweet potato in China. *Acta Phytopath Sinica*, 2012, 42(1): 10–16.  
乔奇, 张振臣, 张德胜, 秦艳红, 田雨婷, 王永江. 中国甘薯病毒种类的血清学和分子检测. 植物病理学报, 2012, 42(1): 10–16. [DOI]
- [4] Zhou QL, Zhang YJ, Huang YD, Li YM, He SL, Yang HK, Liu LS, Wang M. Effect of sweet potato virus disease (SPVD) on sweet potato yield formation. *Jiangsu J Agric Sci*, 2014, 30(1): 42–46.  
周全卢, 张玉娟, 黄迎冬, 李育明, 何素兰, 杨洪康, 刘莉莎, 王梅. 甘薯病毒病复合体(SPVD)对甘薯产量形成的影响. 江苏农业学报, 2014, 30(1): 42–46. [DOI]
- [5] Dong F, Zhang CF. Progress and prospects on prevention and control measures of virus disease in sweet potato. *Crops*, 2016, (3): 6–11.  
董芳, 张超凡. 甘薯病毒病防控措施研究进展与展望. 作物杂志, 2016, (3): 6–11. [DOI]
- [6] He J, Ma ZQ, Zhang X. Review of botanical pesticide. *J Northwest Sci-Tech Univ Agri For (Nat Sci Ed)*, 2006, 34(9): 79–85.  
何军, 马志卿, 张兴. 植物源农药概述. 西北农林科技



- 大学学报(自然科学版), 2006, 34(9): 79–85. [DOI]
- [7] Wang LG, Ma Q. Inhibition of plant viruses by natural products. *Chinese J Biol Control*, 2000, 16(3): 127–130. 王利国, 马祁. 天然产物对植物病毒的抑制作用. *中国生物防治*, 2000, 16(3): 127–130. [DOI]
- [8] Scholthof KBG, Scholthof HB, Jackson AO. Control of plant virus diseases by pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Plant Physiol*, 1993, 102(1): 7–12. [DOI]
- [9] Fuchs M, Gonsalves D. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annu Rev Phytopathol*, 2007, 45: 173–202. [DOI]
- [10] Wang PA, Wu LJ, Yang YK, Wu LC, Ku LX, Chen YH. The antiviral strategies and potential risks of virus-resistant transgenic plants. *Henan Agric Sci*, 2011, 40(2): 19–24. 王平安, 吴刘记, 杨艳坤, 吴连成, 库丽霞, 陈彦惠. 转基因植物抗病毒策略及其风险分析. *河南农业科学*, 2011, 40(2): 19–24. [DOI]
- [11] Register III JC, Beachy RN. Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection. *Virology*, 1988, 166(2): 524–532. [DOI]
- [12] Miller WA, Koev G, Mohan BR. Are there risks associated with transgenic resistance to luteoviruses?. *Plant Dis*, 1997, 81(7): 700–710. [DOI]
- [13] Falk BW, Bruening G. Will transgenic crops generate new viruses and new diseases?. *Science*, 1994, 263(5152): 1395–1396. [DOI]
- [14] Pruss G, Ge X, Shi XM, Carrington JC, Vance VB. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell*, 1997, 9(6): 859–868. [DOI]
- [15] Golemboski DB, Lomonosoff GP, Zaitlin M. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(16): 6311–6315. [DOI]
- [16] Lapidot M, Gafny R, Ding B, Wolf S, Lucas WJ, Beachy RN. A dysfunctional movement protein of tobacco mosaic virus that partially modifies the plasmodesmata and limits virus spread in transgenic plants. *Plant J*, 1993, 4(6): 959–970. [DOI]
- [17] Zrachya A, Kumar PP, Ramakrishnan U, Levy Y, Loyter A, Arazi T, Lapidot M, Gafni Y. Production of siRNA targeted against TYLCV coat protein transcripts leads to silencing of its expression and resistance to the virus. *Transgenic Res*, 2007, 16(3): 385–398. [DOI]
- [18] Jiang L, Wei CH, Li Y. Viral suppression of RNA silencing. *Sci China Life Sci*, 2012, 55(2): 109–118. [DOI]
- [19] Kreuze JF, Savenkov EI, Cuellar W, Li XD, Valkonen JPT. Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *J Virol*, 2005, 79(11): 7227–7238. [DOI]
- [20] Butterbach P, Verlaan MG, Dullemans A, Lohuis D, Visser RGF, Bai YL, Kormelink R. Tomato yellow leaf curl virus resistance by *Ty-1* involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by cucumber mosaic virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(35): 12942–12947. [DOI]
- [21] Shen Y, Xiao A, Huang P, Wang WY, Zhu ZY, Zhang B. TALE nuclease engineering and targeted genome modification. *Hereditas (Beijing)*, 2013, 35(4): 395–409. 沈延, 肖安, 黄鹏, 王唯晔, 朱作言, 张博. 类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)介导的基因组定点修饰技术. *遗传*, 2013, 35(4): 395–409. [DOI]
- [22] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709–1712. [DOI]
- [23] Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 2008, 322(5909): 1843–1845. [DOI]
- [24] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao YJ, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607. [DOI]
- [25] Symington LS, Gautier J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 247–271. [DOI]
- [26] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821. [DOI]
- [27] Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(1): 5–15. [DOI]
- [28] Bi YW, Sun L, Gao DD, Ding C, Li ZH, Li YD, Cun W, Li QH. High-efficiency targeted editing of large viral genomes by RNA-guided nucleases. *PLoS Pathog*, 2014, 10(5): e1004090. [DOI]
- [29] Hu WH, Kaminski R, Yang F, Zhang YG, Cosentino L, Li F, Luo B, Alvarez-Carbonell D, Garcia-Mesa Y, Karn J,



- Mo XM, Khalili K. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(31): 11461–11466. [DOI]
- [30] Zhen S, Hua L, Liu YH, Gao LC, Fu J, Wan DY, Dong LH, Song HF, Gao X. Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus. *Gene Ther*, 2015, 22(5): 404–412. [DOI]
- [31] Wang JB, Quake SR. RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(36): 13157–13162. [DOI]
- [32] Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, Ali S, Tashkandi M, Mahfouz MM. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome Biol*, 2015, 16: 238. [DOI]
- [33] Ji X, Zhang HW, Zhang Y, Wang YP, Gao CX. Establishing a CRISPR-Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nat Plants*, 2015, 1(10): 15144. [DOI]
- [34] Baltes NJ, Hummel AW, Konecna E, Cegan R, Bruns AN, Bisaro DM, Voytas DF. Conferring resistance to gemini-viruses with the CRISPR-Cas prokaryotic immune system. *Nat Plants*, 2015, 1: 15145 (2015). [DOI]
- [35] Nelles DA, Fang MY, O'Connell MR, Xu JL, Markmiller SJ, Doudna JA, Yeo GW. Programmable RNA tracking in live cells with CRISPR/Cas9. *Cell*, 2016, 165(2): 488–496. [DOI]
- [36] O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, East-Seletsky A, Kaplan M, Doudna JA. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*, 2014, 516(7530): 263–266. [DOI]
- [37] Price AA, Sampson TR, Ratner HK, Grakoui A, Weiss DS. Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(19): 6164–6169. [DOI]
- [38] Hull R, Brown F, Payne C. Virology: directory and dictionary of animal, bacterial and plant viruses. Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc., 1989. [DOI]
- [39] Londoño A, Riego-Ruiz L, Argüello-Astorga GR. DNA-binding specificity determinants of replication proteins encoded by eukaryotic ssDNA viruses are adjacent to widely separated RCR conserved motifs. *Arch Virol*, 2010, 155(7): 1033–1046. [DOI]
- [40] Wang Z, Pan QH, Gendron P, Zhu WJ, Guo F, Cen S, Wainberg MA, Liang C. CRISPR/Cas9-derived mutations both inhibit HIV-1 replication and accelerate viral escape. *Cell Rep*, 2016, 15(3): 481–489. [DOI]
- [41] Chuong EB, Elde NC, Feschotte C. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science*, 2016, 351(6277): 1083–1087. [DOI]
- [42] Bondy-Denomy J, Garcia B, Strum S, Du M, Rollins MF, Hidalgo-Reyes Y, Wiedenheft B, Maxwell KL, Davidson AR. Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins. *Nature*, 2015, 526(7571): 136–139. [DOI]
- [43] Maxwell KL. Phages fight back: inactivation of the CRISPR-Cas bacterial immune system by anti-CRISPR proteins. *PLoS Pathog*, 2016, 12(1): e1005282. [DOI]
- [44] Aguirre AJ, Meyers RM, Weir BA, Vazquez F, Zhang CZ, Ben-David U, Cook A, Ha G, Harrington WF, Doshi MB, Kost-Alimova M, Gill S, Xu H, Ali LD, Jiang GZ, Pantel S, Lee Y, Goodale A, Cherniack AD, Oh C, Kryukov G, Cowley GS, Garraway LA, Stegmaier K, Roberts CW, Golub TR, Meyerson M, Root DE, Tsherniak A, Hahn WC. Genomic copy number dictates a gene-independent cell response to CRISPR/Cas9 targeting. *Cancer Discov*, 2016, doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0154. [DOI]
- [45] Levasseur A, Bekliz M, Chabrière E, Pontarotti P, La Scola B, Raoult D. MIMIVIRE is a defence system in mimivirus that confers resistance to virophage. *Nature*, 2016, 531(7593): 249–252. [DOI]
- [46] Pardee K, Green AA, Takahashi MK, Braff D, Lambert G, Lee JW, Ferrante T, Ma D, Donghia N, Fan M, Daringer NM, Bosch I, Dudley DM, O'Connor DH, Gehrke L, Collins JJ. Rapid, low-cost detection of zika virus using programmable biomolecular components. *Cell*, 2016, 165(5): 1255–1266. [DOI]
- [47] López MM, Llop P, Olmos A, Marco-Noales E, Cambra M, Bertolini E. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses?. *Curr Issues Mol Biol*, 2009, 11(1): 13–46. [DOI]
- [48] Bogerd HP, Kornepati AVR, Marshall JB, Kennedy EM, Cullen BR. Specific induction of endogenous viral restriction factors using CRISPR/Cas-derived transcriptional activators. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(52): E7249–E7256. [DOI]
- [49] Mandegar MA, Huebsch N, Frolov EB, Shin E, Truong A, Olvera MP, Chan AH, Miyaoka Y, Holmes K, Spencer CI, Judge LM, Gordon DE, Eskildsen TV, Villalta JE, Horlbeck MA, Gilbert LA, Krogan NJ, Sheikh SP, Weissman JS, Qi LS, So PL, Conklin BR. CRISPR interference efficiently induces specific and reversible gene silencing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2016,

- 18(4): 541–553. [DOI]
- [50] Silas S, Mohr G, Sidote DJ, Markham LM, Sanchez-Amat A, Bhaya D, Lambowitz AM, Fire AZ. Direct CRISPR spacer acquisition from RNA by a natural reverse transcriptase-Cas1 fusion protein. *Science*, 2016, 351(6276): aad4234. [DOI]
- [51] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823. [DOI]
- [52] Fujii W, Kawasaki K, Sugiura K, Naito K. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(20): e187. [DOI]
- [53] Kim D, Kim J, Hur JK, Been KW, Yoon SH, Kim JS. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 2016, doi: 10.1038/nbt.3609. [DOI]
- [54] Hur JK, Kim K, Been KW, Baek G, Ye S, Hur JW, Ryu SM, Lee YS, Kim JS. Targeted mutagenesis in mice by electroporation of Cpf1 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol*, 2016, doi: 10.1038/nbt.3596. [DOI]
- [55] Ma XL, Zhang QY, Zhu QL, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang ZF, Li HY, Lin YR, Xie YY, Shen RX, Chen SF, Wang Z, Chen YL, Guo JX, Chen LT, Zhao XC, Dong ZC, Liu YG. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant*, 2015, 8(8): 1274–1284. [DOI]
- [56] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6): 1380–1389. [DOI]
- [57] Zaitlin M, Hull R. Plant virus-host interactions. *Annu Rev Plant Physiol*, 1987, 38: 291–315. [DOI]
- [58] Shipman SL, Nivala J, Macklis JD, Church GM. Molecular recordings by directed CRISPR spacer acquisition. *Science*, 2016, doi: 10.1126/science.aaf1175. [DOI]

(责任编辑: 高彩霞)

## • 综合信息 •

### 欢迎订阅 2017 年《中国生态农业学报》

《中国生态农业学报》由中国科学院遗传与发育生物学研究所和中国生态经济学会主办, 中国科学院主管, 科学出版社出版。系中国期刊方阵双效期刊、中国科技精品期刊、百种中国杰出学术期刊、中文核心期刊、RCCSE 中国权威学术期刊, 为中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊文摘、中国科学引文数据库、中国科技论文与引文数据库、CNKI 中国期刊全文数据库源刊, 并被国际农业生物学文摘(CABI)、美国化学文摘(CA)、哥白尼索引(IC)、美国乌利希国际期刊指南等国际数据库及检索单位收录。荣获第三届、四届全国农业优秀期刊一等奖和首届北方优秀期刊奖, 中国北方优秀期刊, 连续多届获得河北省优秀期刊奖。

《中国生态农业学报》主要报道全球环境变化与农业、农业生态系统与生态农业理论基础、农田生态系统与农业资源、生态农业模式和技术体系、农业生态经济学、农业环境质量及环境保护、农业有害生物的综合防治等领域创新性研究成果。适于从事农业生态学、生态学、生态经济学以及环境保护等领域科技人员、高等院校有关专业师生, 农业及环境管理工作者和基层从事生态农业建设的技术人员阅读与投稿。

《中国生态农业学报》国内外公开发行, 国内刊号 CN13-1315/S, 国际刊号 ISSN1671-3990。月刊, 国际标准大 16 开本, 160 页, 每期定价 35 元, 全年 420 元。邮发代号: 82-973, 全国各地邮局均可订阅。漏订者可直接汇款至编辑部补订(需另加邮资 50.00 元/年)。

地址: (050022) 河北省石家庄市槐中路 286 号 中科院遗传发育所农业资源研究中心《中国生态农业学报》编辑部

电话: (0311) 85818007

传真: (0311) 85815093

网址: <http://www.ecoagri.ac.cn>

E-mail: [editor@sjziam.ac.cn](mailto:editor@sjziam.ac.cn)

公众微信号: zgstnyxb