

基因编辑技术在棉花种质创新和遗传改良中的应用

侯文婷^{1, 2} 孙琳² 张艳军² 董合忠^{1, 2}

(1. 山东师范大学生命科学学院, 济南 250000; 2. 山东省农业科学院经济作物研究所, 济南 250000)

摘要: 棉花是全球重要的经济作物和纺织工业原料, 选育优良新品种是提高棉花产量、品质和植棉效益的主要途径。然而, 传统育种方法在改良作物遗传特性方面存在很大的局限性, 而基因编辑技术为加快棉花种质创新和遗传改良提供了契机。基因编辑技术是一种利用人工设计的核苷酸酶, 对生物体特定 DNA 序列的基因组片段进行删除、修改、插入或替换单个或多个核苷酸, 从而实现目标基因精确编辑的技术方法。本文首先综述了 ZFNs、TALENs 和 CRISPR 三种主要基因编辑系统的原理, 以更好地理解如何利用基因编辑技术改良棉花的生长发育、抗逆性等性状; 其次, 重点评述了当前备受关注的 CRISPR 基因编辑系统在改良棉花抗逆性、纤维与种子品质性状等方面的应用; 最后分析了基因编辑技术在应用过程中存在的不足和局限, 并指出未来应进一步优化开发有知识产权的基因编辑系统, 提高其精确性、安全性, 促进其在棉花种质创新和遗传改良中的应用。

关键词: 基因编辑; 棉花; 遗传改良; CRISPR/Cas9

DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2023-1054

Application of Gene-editing Technology for Germplasm Innovation and Genetic Improvement in Cotton

HOU Wen-ting^{1, 2} SUN Lin² ZHANG Yan-jun² DONG He-zhong^{1, 2}

(1. School of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250000; 2. Research Institute of Economic Crops, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250000)

Abstract: Cotton is a globally important cash crop and a crucial raw material for the textile industry. Breeding superior cultivars is the primary approach for increasing cotton yield, fiber quality and agronomic benefits. While traditional breeding methods are increasingly limited in improving the genetic traits of crops, gene editing technology offers opportunities to promote germplasm innovation and genetic improvement in cotton. Gene editing is a technology that utilizes engineered nucleases to precisely edit the DNA sequences of an organism's genome by deleting, modifying, inserting or replacing individual or multiple nucleotides in specific target genes. This article reviews the principles of three major gene editing systems, namely ZFNs, TALENs, and CRISPR, aiming to better understand how gene editing technology can be used to enhance cotton growth, development, and stress tolerance. Specifically, a comprehensive overview of the CRISPR gene editing system, which has gained significant attention, is provided, summarizing its current applications in improving cotton stress tolerance and other desirable traits. In addition, this article analyzes the shortcomings and limitations of gene editing technology, emphasizes the need for further research of optimizing and developing gene editing system with intellectual property right as well as increasing its accuracy and safety, and thus leverage its application in germplasm innovation and genetic improvement in cotton.

Key words: gene editing; cotton; genetic improvement; CRISPR/Cas9

棉花是全球重要的经济作物和纺织工业原料。我国是世界产棉和用棉大国, 棉花产业对我国国民

经济发展、棉区农民收入和乡村振兴皆具有重要意义。棉花遗传改良和新品种选育一直是棉花产业发

收稿日期: 2023-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771718), 国家重点研发计划课题(2020YFD1001002), 山东省农业科学院创新工程(CXGC2023F06)

作者简介: 侯文婷, 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物分子生物学; E-mail: skydtb@163.com

通信作者: 孙琳, 女, 博士, 研究方向: 棉花分子生物学; E-mail: 15071329431@163.com;

董合忠, 男, 博士, 研究员, 研究方向: 棉花育种与栽培; E-mail: donghezhong@163.com

展的重点和难点,但传统育种方法局限性日益显现,难以满足棉花生产的现实需求,而基因编辑技术为此提供了新的解决方案,因此备受关注。基因编辑技术是一种利用人工设计的核苷酸酶,对具有特定DNA序列的生物体基因组片段进行删除、修改、插入或替换单个或多个核苷酸,从而实现对目标基因精确编辑的技术方法^[1-2]。借助基因编辑技术,可以实现对棉花等作物生长发育、品质以及抗逆性等性状的高精度突变,拓宽了变异策略的水平,加速了育种进程,同时也为优质新品种的选育创造了更有利的条件。

目前广泛栽培的棉花是异源四倍体,其基因组较为复杂,且重要性状往往由多基因控制,包括纤维质量、抗病虫性等,这大大增加了基因组编辑的复杂性。目前应用于植物领域的基因编辑技术主要包括ZFNs基因编辑系统、TALENs基因编辑系统和CRISPR基因编辑系统。其中,CRISPR/Cas9基因编辑系统具有高效、精确和成本低廉等优点,因此被广泛应用于各个领域。就棉花而言,该技术可以针对棉花生长发育、纤维品质和抗逆性等方面的关键基因进行高精度的编辑操作,从而创制具有重要优良性状的品种或种质。本文综述了CRISPR技术在棉花遗传改良中的应用现状、存在问题及未来发展前景,以期对相关领域的研究提供参考和支持。

1 基因编辑系统的主要种类和特点

1.1 ZFNs和TALENs基因编辑系统

锌指结构(ZF)蛋白由两个保守的半胱氨酸和两个保守的组氨酸组成,可以招募锌离子折叠成 β -折叠和 α -螺旋构象,其中 α -螺旋可以与DNA之前发生相互作用并识别DNA上3-4个碱基对^[1]。具有Fok I内切酶结构域的锌指(ZF)蛋白可以作为位点特异性核酸酶对核苷酸序列进行剪切、删除,并通过非同源端连接(NHEJ)或同源重组(HR)激活DNA修复机制,修复过程中容易导致基因功能破坏^[2]。TALENs是基因组编辑核酸酶三大类之一,其原理与ZFNs相似,由TALE蛋白中的DNA结合域与Fok I内切酶进行融合创建^[3]。TALEN基因编辑技术已在人类细胞、小鼠、斑马鱼、水稻、玉米等物种中成功应用^[4-8]。

1.2 CRISPR基因编辑系统

ZFNs和TALENs技术的出现提高了基因编辑的效率,但二者对于不同的基因位置都需要设计不同的蛋白质,操作成本高、流程烦琐,因而应用受到了限制。CRISPR系统问世之后,恰好弥补了以上基因编辑技术的缺陷。CRISPR系统是在细菌和古生菌中首次发现的,它出现带来了基因编辑领域全新的突破。CRISPR形成了免疫系统的一部分,保护其免受外来核酸的侵害^[9]。目前使用最广泛的是来自酿脓链球菌的II型CRISPR/Cas9系统。

1.2.1 CRISPR/Cas9 CRISPR/Cas9是一种由RNA引导的核酸酶,它的特异性依靠sgRNA。当sgRNA存在时,CRISPR/Cas9可以结合到含有PAM位点的DNA序列上进行剪切,形成DNA双链断裂,细胞启动DNA修复,易产生突变,从而实现基因编辑。与其他基因编辑技术相比,CRISPR/Cas9可以通过改变sgRNA的序列来快速、灵活地指定不同的靶点^[10],使得Cas9核酸酶在不同的位点上发挥作用,因此具有多重编辑的能力。Xie等^[11]针对丝裂原激活蛋白激酶基因家族中的4个成员设计了8个sgRNA进行切除,原生质体转化后发现,4个目标位点均被高效切除,转化后的植株中8个位点都显示突变,但是仅仅在两个位点检测出了片段缺失。由此可见,利用CRISPR/Cas9可大大提高实验效率。Wang等^[12]首次成功创建适用于陆地棉的CRISPR/Cas9基因组编辑系统,将外源基因红色荧光蛋白2(DsRed2)和内源基因*GhCLA1*作为目标,每个靶位点编辑效率达到66.7%~100%;Chen等^[13]利用CRISPR/Cas9系统对陆地棉进行基因组编辑和靶向诱变,分别靶向棉花*GhCLA1*和*GhVP*基因的不同位点发现,在转基因棉花中的突变效率为47.6%~81.8%;Gao等^[14]发现在棉花中可以同时表达多个sgRNA可以实现多基因靶向,并在两个靶点产生*GhPDS*和*GhEF1*突变。充分表明了CRISPR系统应用于棉花遗传改良的可靠性和广阔前景。

CRISPR/Cas9系统的编辑效率可以利用双生病毒滚环复制子来提高,双生病毒载体能以滚环复制的方式在植物细胞中产生大量的供体模板,并且其在生物体内能够快速复制表达,而不会随机插入到

植物基因组内,从而避免对生物体产生毒害作用。Li 等^[15]利用这一特点使 CRISPR/Cas9 系统在棉花中的基因编辑效率显著提高,他们构建了双生病毒介导的基因编辑载体,这种载体的编辑效率高达 73.3%。此外,还发现基因突变类型中片段缺失的比例也有所提高,并且缺失片段的长度也增加。表明这种改进的 CRISPR/Cas9 系统在棉花中的基因编辑效果得到了显著的改善。

1.2.2 碱基编辑器 单核苷酸突变是改良作物许多重要农艺性状的遗传基础。然而在常规基因编辑的过程中,CRISPR/Cas9 会产生 DNA 双链的断裂,而修复机制 NHEJ 产生的突变是不定向的,很难获得理想的预期突变;而同源重组修复(HDR)虽然可以产生定向突变,但其编辑效率较低^[16]。为此,研究人员对 CRISPR/Cas9 系统进行了改造,例如引入了不同类型的碱基脱氨酶,开发出多个新型的碱基编辑器,如胞嘧啶碱基编辑器(CBE)和腺嘌呤碱基编辑器(ABE)等,可以实现对于靶基因的精准编辑。

CBE 是第 1 类单碱基编辑器,可避免 Cas9 引起 DSB 导致的随机突变。其原理是通过将 Cas9 蛋白序列中第 10 位氨基酸 Asp 替换为 Ala (D10A),使 RuvC 结构域失去切割 DNA 的能力,但保留了 HNH 结构域的核酸酶功能,所以 nCas9D10A 只会切割与 sgRNA 互补的单链 DNA,而脱氨酶 APOBEC1 通过编辑活性窗口(C4-C8)中的 C 脱氨成 U,在 UGI 的保护下,避免 U 被 UNG 水解。细胞自身对 DNA 的修复作用,可将 U:G 错配修复为 U:A,然后在 DNA 复制后,可产生 T:A,实现 C:G 至 T:A 替换。其互补链则发生相应的 G>A 替换^[17]。Zong 等^[18]成功开发出适用于植物的 CBE 编辑器 nCas9-PBE,在原生质体再生的水稻、小麦和玉米植株中,以高达 43.48% 的频率实现了胞嘧啶从位置 3 到 9 的靶向转化为胸腺嘧啶。另外,华中农业大学棉花遗传改良团队创建了适用于棉花的单碱基编辑系统,使 C-T 的编辑效率提高到 57.78%^[19]。

胞嘧啶的自发脱氨是 C:G 到 T:A 碱基对转变的主要来源,占人类已知致病性点突变的一半。因此,有效地将靶向 A:T 碱基对转化为 G:C 可以推进遗传疾病的研究和治疗。腺嘌呤的脱氨反应产生肌

苷(I),肌苷被聚合酶当作鸟嘌呤处理将 I:T 错配修复成 I:C,进而在 DNA 复制后产生 G:C,实现 A:T 至 G:C 的碱基替换^[20]。Gaudelli 等^[21]成功获得介导基因组 DNA 中 A:T 到 G:C 转化的腺嘌呤编辑器(ABEs),ABEs 有效地将目标 A:T 碱基对转化为 G:C (在人类细胞中效率约为 50%),产品纯度高(通常至少 99.9%),indel 率低(通常不超过 0.1%)。与基于 Cas9 核酸酶的方法相比,ABEs 可以更有效引入点突变,并且产生较少的脱靶基因组修饰。Tan 等^[22]开发出植物编辑器 PhieABE,通过高活性的腺苷脱氨酶 TadA8e 和单链 DNA 结合域(DBD)与 Cas9 (SpCas9)内切单链酶变体,识别 PAM 位点 NGN 或 NNN,以水稻为靶标进行结果评估发现一些被检测位点出现接近 100% 的编辑效率。有研究利用 Cas9 突变体(nCas9, dCas9)以及突变失活的 Cpf1 (dCpf1),4 个腺嘌呤脱氨酶(TadA6.3, 7.8, 7.9, 7.10),在棉花中成功构建了多个腺嘌呤单碱基编辑系统(GhABEs),进一步丰富了棉花单碱基编辑工具的类型^[23]。

1.2.3 CRISPR/Cas12a 系统 CRISPR/Cas12a 系统属于 V 型 CRISPR 系统,从整体来看与 CRISPR/Cas9 工作原理相似,是依靠 RNA 分子来产生 DSBs^[24],但从组成结构来看仍与 CRISPR/Cas9 存在较大差异。首先,CRISPR/Cas12a 只需要一个 crRNA 分子,而且体积比 Cas9 蛋白小得多,这就使得在多基因编辑上 CRISPR/Cas12a 具有更大的优势^[25];其次,Cas12a 更加倾向于富含 T 的 PAM 位点上,而 Cas9 酶识别富含 G 序列的 PAM,这也就意味着对于不同的目标序列,可能需要选择不同类型的 CRISPR 酶来进行基因编辑^[26]。Li 等^[27]创建了适用于棉花的 CRISPR/Cas12a 系统靶向棉花 *GhCLA* 基因,编辑效率达到 87%,且无脱靶效应,证实了 CRISPR/Cas12a 系统在棉花中是一个具有高特异性和高编辑效率的系统,而且有望替代 CRISPR/Cas9 系统在棉花中实现大规模应用。

1.2.4 CRISPR/Cas12b 系统 CRISPR/Cas12b 具有特殊的热诱导系统,需要在 40-55℃ 范围内才可发生反应,当温度低于 40℃ 时裂解无法完成^[28]。棉花是一种喜温作物,短暂高温处理不会影响棉花生长,凭借这一特点,Wang 等^[29]成功建立了棉花热诱导

基因编辑系统，只需要在短暂高温诱导的情况下就会发生基因编辑，当细胞生长温度恢复到 25–30℃ 时，该系统则处于“沉默状态”，能够有效降低脱靶的可能性。

综上所述，CRISPR 系统相对于传统的转基因技术有显著的优势。CRISPR 系统基于 RNA-DNA 互补配对机制，因此具备了更高效、更精准的编辑能力，并可以同时编辑多个基因位点，是最具发展前景的基因编辑技术之一。近年来，由于其编辑效率高、操作流程简便灵活，以及能够同时编辑多个位点的能力，CRISPR 系统在各种作物中得到了广泛应用。

2 CRISPR/Cas9 系统在棉花中的应用

2.1 棉花抗逆性研究

CRISPR/Cas9 技术已成功应用于改良作物的抗病性，棉花也是其中的成功案例之一。通过编辑抗病关键酶基因或编码伴侣蛋白基因等，目前已成功提高了水稻、番茄、小麦、玉米和棉花等作物的抗病能力和产量 [30–32]。

棉花受到多种病虫害的威胁，严重影响棉花的生长发育和产量形成，造成经济损失。其中，常见的虫害包括棉铃虫、红铃虫、蚜虫等；而常见的病害则包括黄萎病、枯萎病等。通过基因编辑技术对棉花中特定关键基因进行编辑，有望提高其抗虫抗病能力和环境适应能力。

黄萎病是由大丽花黄萎病引起的一种土壤传染病，是棉花最具破坏性的病害之一。大丽花弧菌通过棉花的根部感染，然后沿着维管组织向上扩散，并分泌毒素，杀死周围的细胞，阻碍棉花维管运输。患病的棉花植株表现为萎黄、枯萎，甚至死亡 [33]。Zhang 等 [34] 利用 CRISPR/Cas9 敲除 *Gh14-3-3d* 基因，在 T0 代转基因棉花中的目标位点上检测出了大量插入与缺失，且能够稳定遗传给下一代，对黄萎病的抗性显著高于野生型。Binyameen 等 [35] 针对棉花卷曲病，利用 CRISPR/Cas9 技术对病毒基因进行靶向编辑，结果显示转基因棉株对于棉花卷曲病的抗性高达 60%–70%。类似地，对于棉花枯萎病相关基因 *Fov7*，CRISPR/Cas9 介导的 *Fov7* 基因敲除使得棉花对枯萎病变得敏感，并丧失了诱导钙内流的能力 [36]。此外，通过 CRISPR/Cas9 同时靶向棉花卷曲

病毒 CLCuV 的 6 个基因，与单个基因靶向相比发现，多个基因的联合靶向更有效地干扰病毒增殖 [37]。

到目前为止，已经发现了许多与棉花抗病性相关的基因(表 1)，通过信号通路如 JA、SA 等发挥作用，对棉花抵抗大丽花真菌起到正向或负向的调节作用。CRISPR/Cas9 系统有望通过定向基因敲除获得突变体，为棉花抗病研究提供更多的参考和育种选择。

表 1 棉花中抗病相关基因

抗病类型	基因名称	参考文献
Type of disease resistance	Gene name	Reference
黄萎病	<i>GhLOX2</i>	[38]
	<i>GbMPK3</i>	[39]
	<i>GbRVd</i>	[40]
	<i>GhODO1</i>	[41]
	<i>GhNAC100</i>	[42]
	<i>GaRPL18</i>	[43]
	<i>GhHB12</i>	[44]
	<i>GhOPR3</i>	[45]
	<i>GhWRKY70D13</i>	[46]
枯萎病	<i>GaGSTF9</i>	[47]

棉花具有较强的耐盐能力，是开发盐碱地的先锋作物。然而，棉花在不同生育期的耐盐能力存在较大差异，苗期耐盐能力最弱，随着生长发育耐盐能力不断增强，在盛花结铃期达到最高点 [48]。但是，棉花的耐盐能力也是有限的。盐胁迫会扰乱棉花体内原有的离子稳态与渗透平衡，因此需要调节重建平衡以应对盐胁迫。目前已知，棉花体内的调节途径包括有丝分裂原活蛋白激酶 MAPK 级联反应信号转导途径、钙依赖型蛋白激酶 CDPK 级联反应参与的信号转导调控途径、盐敏感 SOS 信号转导途径 [49]。SOS 信号转导途径是调节植物耐盐性的主要途径之一 [50]。目前，利用 CRISPR/Cas9 系统提高棉花耐盐能力和发掘棉花功能基因方面的研究尚未有突破性进展。然而，在水稻上的相关研究进展已经展示出基因编辑提高耐盐性的可行性和巨大潜力。例如，通过 CRISPR/Cas9 系统使水稻中的 *OsDST* 基因产生突变，可以通过增加叶片宽度与降低气孔密度，从而提高叶片的保水性，增强水稻的耐盐与耐

旱性^[51]。同时,许多与棉花耐盐性有关的转运蛋白、转录因子以及关键基因已被报道,包括 CIPK、MYB、NAC、LEA、WD40、CDPK 等家族^[52]。通过基因编辑技术提高棉花耐盐性的前景看好。

干旱是影响棉花生长发育和产量品质形成的重要限制因素之一。棉花各个生育阶段对干旱的敏感程度不同,其中幼苗、开花和棉铃发育阶段最为敏感^[53]。目前,已有研究报道了 CRISPR/Cas9 系统在棉花抗旱方面的应用,并发现了一些与棉花抗旱相关的基因。例如,通过 CRISPR/dCas9-TV 系统高效上调棉花内源基因 *GhTULP34* 和 *GhTLP19*,可以显著提高突变体材料的抗旱能力^[54]。另外,通过过表达拟南芥液泡 H⁺ 焦磷酸酶基因 *AVP1* 和碱性转录因子基因 *AtRAV1/2* 以及亮氨酸拉链转录因子基因 *AtABI5*,在棉花中观察到了耐旱表型的表现^[55-56]。此外,通过过表达水稻的 *SNAC1* 基因(转录因子 NAC 基因家族成员)和 *AVP1* 基因以及 *AtNHX1* 基因,棉花在亏缺灌溉和旱作条件下展现出更好的耐旱和耐盐性^[57-58]。除了上述基因,一些与棉花耐旱性相关的转录因子也被发现,如拟南芥转录因子基因 *AtEDT-1/HDG11* 可以通过促进根系发育和增强抗氧化防御机制来提高转基因棉花的耐旱性^[59]。由此可见,CRISPR/Cas9 技术和转基因技术为提高棉花的耐旱性提供了可靠的途径。

高温胁迫也会对棉花产量和品质造成负面影响。研究发现,在高温下,耐高温品种中的 *GhAOS* 和 *GhAOC2* 基因表达较高,而敏感品种中的表达变化不大,这可能是导致高温下棉花雄性不育的原因。为验证这一预测,利用 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术,在敏感品种中得到了 *GhAOS* 和 *GhAOC2* 基因突变体,结果显示突变体表现出明显的雄性不育表型^[60]。这项研究深入揭示了高温导致棉花雄性不育的机制。

刺吸式害虫对棉花产量的破坏性较大。Sun 等^[61]利用 CRISPR/Cas9 技术靶向棉花内源抗虫相关基因,在植株中生成了基因突变体。结果显示,超过 10% 的基因突变体表现出对虫害的抗性改变。此外,还发现 *GhMLP423* 基因可以响应昆虫取食信号,进一步诱导其他基因的表达,来抵御昆虫取食。

2.2 棉花纤维和种子品质改良

棉花纤维是决定棉花产量和纺纱品质的关键,比化学纤维具有更强的保水、保热能力^[62]。棉花纤维是由棉花子房胚珠外表皮细胞经过分化突起而形成^[63],大量基因参与和调控^[64]。纤维长度是棉纤维最重要的质量参数之一。通过棉纤维转录组分析发现, *GhAlaRP* 可以与 *GhAnnexin* 和 *GhEXPA* 互作调控纤维伸长。应用 CRISPR/Cas9 技术产生的棉花纤维素合成酶基因突变导致纤维长度和强度分别下降了 6.03% 与 12.10%^[65]。此外,转基因棉花植株的成熟棉纤维捻数增加,表面更光滑,纤维素结晶度指数较低。

棉花是全球第四大植物油来源^[66]。棉籽油主要由三酰基甘油组成,其中不饱和脂肪酸占 65%~70%,而不饱和脂肪酸中亚油酸又占大多数;除主要脂肪酸外,棉籽油还含有肉豆蔻酸、花生酸等^[67],能够降低胆固醇以及具有抗氧化功效。棉籽油的合成过程中酮脂酰 ACP 还原酶和烯脂酰 ACP 还原酶是脂肪酸合成过程中两个关键的还原酶,主要负责脂肪酸碳链的延伸。刘雨等^[68]克隆了上述两个酶的基因 *GhKAR* 和 *GhENR* 发现,转基因植株的含油量提高了 10.2%~14.1%。Chen 等^[66]根据基因表达分析发现 *GhFAD2-1A/D* 主要在种子中表达,且在种子发育中后期表达量更高,推测该基因与种子油分组成相关。利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 *GhFAD2-1A/D*,在突变体种子中油酸含量显著升高,亚油酸含量显著降低,且不影响棉花产量、纤维品质和种子总油量。此外,通过 CRISPR/Cas9 技术去除棉籽中对哺乳动物有害的左旋棉酚,获得了无毒和低毒棉籽,不影响其抗虫性^[69],为棉籽的安全利用开辟了新途径。

2.3 棉花其他性状改良

除了上述应用以外,基因编辑技术在棉花基因功能验证方面也被广泛应用。利用 CRISPR/Cas9 系统成功敲除了陆地棉同种异体四倍体 A 染色体和 D 染色体上的 *GhARG* 基因,并发现在高氮和低氮条件下,CRISPR/Cas9 介导的突变均显著改善了棉花侧根的发育^[70]。另外,通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术获得的突变体,研究揭示了细胞色素 P450 单加氧酶 *GhCYP703A2* 在 ms5ms6 品系的花粉形成中起

核心作用^[71]。Zhu 等^[72]在研究棉花体细胞胚胎发生途径的过程中，利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑和过表达证明了 *LAX2*、*LAX1* 和 *LOX3* 在愈伤组织增殖和植物再生中的重要作用，为深入解析棉花代谢相关基因在作物适应性和生长发育方面的作用提供了重要信息。

总之，CRISPR/Cas9 技术在棉花抗旱、抗病虫和纤维与种子品质改良等方面展现出具有巨大潜力。然而，与其他大宗农作物相比，棉花有其自身的特性。棉花纤维和种子都是收获对象，协同调控两者生长发育的意义大，但颇具挑战性；棉花具有无限生长习性，株型可塑性大，这对产量和品质形成有重要影响；棉花营养器官和生殖器官中皆含有棉酚，影响棉花副产品的综合利用，减少或抑制棉酚合成积累的意义重大；作物源库理论形成于棉花“叶-铃”关系，深入研究棉花“叶-铃”关系具有重要的理论和实践意义。这些方面的研究曾长期基于传统技术，取得进展的难度越来越大，而基因编辑技术可以在这些方面的研究发挥重要作用，值得期待。

3 基因编辑技术面临的挑战及展望

3.1 CRISPR/Cas9 的局限和应对

在基因编辑和育种过程中，高特异性和精确的基因编辑是至关重要的。如果脱靶事件发生，将导致基因组不稳定、破坏正常的基因功能，并阻碍育种过程。

降低脱靶效应的手段有以下几种：一是增加 sgRNA 中 GC 的含量。在设计 sgRNA 时保证 GC 含量在 40%–60% 之间，以此来增加 DNA 与 RNA 结合的牢固性，降低脱靶可能性^[73]。二是控制 sgRNA 长度。在精确的基因靶向过程中，不同长度的 gRNA 定向靶向会导致数量或位置的错配。通常 gRNA 的典型长度为 20 bp，如果 sgRNA 被截断，CRISPR/Cas9 的脱靶效应就会降低，将 sgRNA 的序列降低到 17–18 bp，gRNA 的靶向特异性就会显著提高^[74]。三是通过调节 sgRNA 和 Cas9 浓度可降低脱靶风险，但浓度降低后，相应的基因组编辑能力也会减弱，要根据实际情况选择合适的 gRNA 和 Cas9 复合物比值^[75]。四是选择合适的递送方式。CRISPR/Cas9 本身组件成分较大，且需要递送到细胞内部发挥作用，

不同的递送方式适用于不同类型的细胞和生物体，因此选择合适的递送方式十分关键，目前常见的递送方式有电穿孔^[76]、病毒介导递送^[77]等。五是改造 Cas9。化脓性链球菌的 SpCas9 和来自金黄色葡萄球菌的 SaCas9 是 CRISPR 基因编辑系统中使用最广泛的 Cas9 同源物，SaCas9 比 SpCas9 短了 300 多个氨基酸，更利于递送，SaCas9 需要更长的 PAM 序列增加了识别的特异性，与 SpCas9 相比明显表现出脱靶效应的减少^[78]。Hu 等^[79]开发的 xCas9 系统具备对多种 PAM 序列（NG、GAA、GAT）的识别功能，该优化系统对基因组编辑的适应性提升了 4 倍，而且该系统的特异性比 SpCas9 高得多，脱靶率更低。

3.2 基因编辑在植物中的安全性应用

植物中基因编辑技术的应用主要通过两种方式来实现：一种是使用无外源 DNA 插入的 DNA-free 的方法完成，该方法是利用蛋白质或 RNA 纳米粒子，将编辑工具直接传递到目标细胞中，而无需引入外源 DNA；另一种是利用常规的转基因技术获得基因编辑植株后，在后代材料中通过自交或杂交等手段将外源插入片段完全剔除，最终获得的基因组编辑植株也没有外源基因的插入。由此可见，基因编辑不仅为作物改良提供了多种可能，如提高产量、改善品质、增加抗性等，而且尤为重要，基因编辑只针对植物自身基因组内部进行修改，避免外源基因整合，可以避免传统的转基因技术应用过程中存在的安全性隐患及伦理问题。利用基因编辑技术获得的材料中没有外源整合，与通过传统育种方法获得的材料相似，因此基因编辑技术在植物中的应用也更加安全，商业化应用也更容易被接受。美国早在 2016 年，利用基因编辑技术培育白蘑菇不受农业部监管^[80]。目前美国等多个国家已经修改了有关植物基因编辑的监管制度，不再将基因编辑作物归类于转基因作物^[81]。这些政策的出台对于基因编辑技术在植物育种中的应用和发展具有极大的促进作用。

在中国，农业农村部于 2019 年发布的《植物新品种培育技术规范》第三十七条中提出了基因编辑植物应符合法律法规的要求等规定。农业农村部于 2022 年 1 月 24 日发布了《农业用基因编辑植物

安全评价指南(试行)》^[82],旨在规范农业用基因编辑植物的安全评价工作。该指南对未引入外源基因的基因编辑植物的安全评价申报程序等进行了规范,并将安全评价分为4种类型:(1)对于目标性状不增加环境安全和食用安全风险的基因编辑植物,在中间试验后可以申请生产应用安全证书。(2)对于目标性状可能增加食用安全风险的基因编辑植物,需在中间试验后提供食用安全数据资料,方可申请生产应用安全证书。(3)对于目标性状可能增加环境安全风险的基因编辑植物,需进行环境释放或生产性试验,并积累环境安全数据资料后,再申请生产应用安全证书。(4)对于目标性状可能增加环境安全和食用安全风险的基因编辑植物,需在中间试验后开展环境释放或生产性试验,积累环境安全和食用安全数据资料后,申请生产应用安全证书。2023年4月,山东舜丰生物科技有限公司研发的高油酸大豆成功获得我国首个基因编辑安全证书,进一步加速了基因编辑技术产业化在我国的发展进程。

3.3 展望

棉花具有庞大且倍性复杂的基因组,含有许多高度重复的序列,这增加了准确选择目标位点的难度;同时,目前适用于棉花的基因编辑工具相对有限。为了加速基因编辑技术在棉花上的应用,未来的研究应注意以下几个方面:

一是继续开发有自主知识产权的新型基因编辑系统。目前,许多基因编辑系统的技术核心仍被国外垄断。为了促进该技术的商业化发展,应优化现有技术的操作过程,并进一步开发适用于棉花特点的具有自主知识产权的新系统,以提高编辑效率和安全性。二是进一步提高基因编辑技术的精确度。为了克服目标位点选择不准确和DNA修复导致的拼接错误等技术瓶颈,降低脱靶的概率,特别是针对棉花基因组特点进行的定制化改良。虽然目前棉花的全基因组测序工作已经完成,但仍有许多重要性状的主效基因未被鉴定,限制了CRISPR/Cas9系统在棉花上的应用。因此,要加强重要性状主效基因的挖掘。三是加强与传统育种技术的结合。基因编辑技术应与传统育种方法有机结合,以加快突破性

品种的育成。四是应根据特定作物特点和市场需求制定有针对性的育种策略与技术路线,实现基因编辑技术的商业化应用。五是关注“DNA-free”的基因编辑技术。这种技术可以避免外源DNA在目标细胞中产生不必要的随机插入或突变,从而提高编辑技术应用的安全性。六是关注新型转化方式与基因编辑技术的结合。由于棉花的复杂基因组结构和遗传机制,它在遗传转化过程中可能呈现出遗传不稳定性。另外,CRISPR/Cas系统的应用需要经历长时间的基因转化过程。随着植物遗传转化方法的改良,出现了无需组织培养的转化方法^[83]和SAMT遗传转化系统^[84]等新型转化方式。推动这些新方法和新技术在棉花研究中的应用,将进一步加快棉花基因功能研究与遗传改良的进程。

综上所述,基因编辑技术在棉花上的应用面临诸多挑战,但随着基因编辑系统的不断开发,基因编辑技术的研发和应用也将进入一个新的阶段。未来的研究应继续开发新的基因编辑系统,加强基因编辑技术与育种技术的结合,并推动基因编辑技术的商业化应用。

参考文献

- [1] Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å [J]. *Science*, 1991, 252 (5007): 809-817.
- [2] Chen KL, Gao CX. TALENs: customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants [J]. *J Genet Genomics*, 2013, 40 (6): 271-279.
- [3] Boch J, Bonas U. *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2010, 48: 419-436.
- [4] Miller JC, Tan SY, Qiao GJ, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29 (2): 143-148.
- [5] Sander JD, Cade L, Khayter C, et al. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29 (8): 697-698.
- [6] Tesson L, Usal C, Ménoret S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29 (8): 695-696.
- [7] Li T, Liu B, Spalding MH, et al. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice [J]. *Nat Biotechnol*, 2012, 30 (5): 390-392.

- [8] Char SN, Unger-Wallace E, Frame B, et al. Heritable site-specific mutagenesis using TALENs in maize [J] . Plant Biotechnol J, 2015, 13 (7) : 1002-1010.
- [9] Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems [J] . Nat Rev Microbiol, 2011, 9 (6) : 467-477.
- [10] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J] . Science, 2012, 337 (6096) : 816-821.
- [11] Xie KB, Minkenberg B, Yang YN. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system [J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112 (11) : 3570-3575.
- [12] Wang PC, Zhang J, Sun L, et al. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system [J] . Plant Biotechnol J, 2018, 16 (1) : 137-150.
- [13] Chen XG, Lu XK, Shu N, et al. Targeted mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using the CRISPR/Cas9 system [J] . Sci Rep, 2017, 7: 44304.
- [14] Gao W, Long L, Tian XQ, et al. Genome editing in cotton with the CRISPR/Cas9 system [J] . Front Plant Science, 2017, 8: 1364.
- [15] Li B, Fu CY, Zhou JW, et al. Highly Efficient Genome Editing Using Geminivirus-Based CRISPR/Cas9 System in Cotton Plant [J] . Cell, 2022, 11 (18) : 2-13.
- [16] Lee ABC, Tan MH, Chai CLL. Small-molecule enhancers of CRISPR-induced homology-directed repair in gene therapy: A medicinal chemist's perspective [J] . Drug Discovery Today, 2022, 9 (27) : 2510-2525.
- [17] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage [J] . Nature, 2016, 533 (7603) : 420-424.
- [18] Zong Y, Wang YP, Li C, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion [J] . Nat Biotechnol, 2017, 35 (5) : 438-440.
- [19] Qin L, Li JY, Wang QQ, et al. High-efficient and precise base editing of C•G to T•A in the allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) genome using a modified CRISPR/Cas9 system [J] . Plant Biotechnol J, 2020, 18 (1) : 45-56.
- [20] 何晓玲, 刘鹏程, 马伯军, 等. 基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑技术研究进展及其在植物中的应用 [J] . 植物学报, 2022, 57 (4) : 508-531.
- He XL, Liu PC, Ma BJ, et al. Advance in gene-editing technology based on CRISPR/Cas9 and its application in plants [J] . Chin Bull Bot, 2022, 57 (4) : 508-531.
- [21] Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage [J] . Nature, 2017, 551 (7681) : 464-471.
- [22] Tan JT, Zeng DC, Zhao YC, et al. PhieABEs: a PAM-less/free high-efficiency adenine base editor toolbox with wide target scope in plants [J] . Plant Biotechnol J, 2022, 20 (5) : 934-943.
- [23] Wang GY, Xu ZP, Wang FQ, et al. Development of an efficient and precise adenine base editor (ABE) with expanded target range in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) [J] . BMC Biol, 2022, 20 (1) : 45.
- [24] Zhan XQ, Lu YM, Zhu JK, et al. Genome editing for plant research and crop improvement [J] . J Integr Plant Biol, 2021, 63 (1) : 3-33.
- [25] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [J] . Cell, 2015, 163 (3) : 759-771.
- [26] Zaidi SSEA, Mahfouz MM, Mansoor S. CRISPR-Cpf1: a new tool for plant genome editing [J] . Trends Plant Sci, 2017, 22 (7) : 550-553.
- [27] Li B, Rui HP, Li YJ, et al. Robust CRISPR/Cpf1 (Cas12a) -mediated genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) [J] . Plant Biotechnol J, 2019, 17 (10) : 1862-1864.
- [28] Yang H, Gao P, Rajashankar KR, et al. PAM-dependent target DNA recognition and cleavage by C2c1 CRISPR-cas endonuclease [J] . Cell, 2016, 167 (7) : 1814-1828.e12.
- [29] Wang QQ, Alariqi M, Wang FQ, et al. The application of a heat-inducible CRISPR/Cas12b (C2c1) genome editing system in tetraploid cotton (*G. hirsutum*) plants [J] . Plant Biotechnol J, 2020, 18 (12) : 2436-2443.
- [30] Bi MX, Wang ZJ, Cheng KY, et al. Construction of transcription factor mutagenesis population in tomato using a pooled CRISPR/Cas9 plasmid library [J] . Plant Physiol Biochem, 2023, 205: 108094.
- [31] Wu YY, Xiao N, Cai Y, et al. CRISPR-Cas9-mediated editing of the *OsHPPD* 3' UTR confers enhanced resistance to HPPD-inhibiting herbicides in rice [J] . Plant Commun, 2023, 4 (5) : 100605.
- [32] Ma WD, Yang J, Ding JQ, et al. CRISPR/Cas9-mediated deletion of large chromosomal segments identifies a minichromosome modulating the *Colletotrichum graminicola* virulence on maize [J] . Int J Biol Macromol, 2023, 245: 125462.
- [33] Fradin EF, Abd-El-Halim A, Masini L, et al. Interfamily transfer of tomato Ve1 mediates *Verticillium* resistance in *Arabidopsis* [J] . Plant Physiol, 2011, 156 (4) : 2255-2265.
- [34] Zhang ZN, Ge XY, Luo XL, et al. Simultaneous editing of two copies of *Gh14-3-3d* confers enhanced transgene-clean plant defense against *Verticillium dahliae* in allotetraploid upland cotton [J] . Front Plant Sci, 2018, 9: 842.
- [35] Binyameen B, Khan Z, Khan SH, et al. Using multiplexed CRISPR/Cas9 for suppression of cotton leaf curl virus [J] . Int J Mol Sci,

- 2021, 22 (22) : 12543.
- [36] Liu SM, Zhang XJ, Xiao SH, et al. A single-nucleotide mutation in a GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE gene confers resistance to *Fusarium* wilt in *Gossypium hirsutum* [J] . *Adv Sci*, 2021, 8 (7) : 2002723.
- [37] Mubarik MS, Wang XK, Khan SH, et al. Engineering broad-spectrum resistance to cotton leaf curl disease by CRISPR-Cas9 based multiplex editing in plants [J] . *GM Crops Food*, 2021, 12 (2) : 647-658.
- [38] Shaban M, Khan AH, Noor E, et al. A 13-Lipoxygenase, GhLOX2, positively regulates cotton tolerance against *Verticillium dahliae* through JA-mediated pathway [J] . *Gene*, 2021, 796/797: 145797.
- [39] Long L, Xu FC, Zhao JR, et al. *GbMPK3* overexpression increases cotton sensitivity to *Verticillium dahliae* by regulating salicylic acid signaling [J] . *Plant Sci*, 2020, 292: 110374.
- [40] Yang J, Ma Q, Zhang Y, et al. Molecular cloning and functional analysis of *GbRVd*, a gene in *Gossypium barbadense* that plays an important role in conferring resistance to *Verticillium* wilt [J] . *Gene*, 2016, 575 (2 Pt 3) : 687-694.
- [41] Zhu YT, Hu XQ, Wang P, et al. *GhODO1*, an R2R3-type MYB transcription factor, positively regulates cotton resistance to *Verticillium dahliae* via the lignin biosynthesis and jasmonic acid signaling pathway [J] . *Int J Biol Macromol*, 2022, 201: 580-591.
- [42] Hu G, Lei Y, Liu JF, et al. The ghr-miR164 and *GhNAC100* modulate cotton plant resistance against *Verticillium dahlia* [J] . *Plant Sci*, 2020, 293: 110438.
- [43] Gong Q, Yang ZE, Wang XQ, et al. Salicylic acid-related cotton (*Gossypium arboreum*) ribosomal protein *GarPL18* contributes to resistance to *Verticillium dahliae* [J] . *BMC Plant Biol*, 2017, 17 (1) : 59.
- [44] He X, Wang TY, Zhu W, et al. *GhHB12*, a HD-ZIP 1 transcription factor, negatively regulates the cotton resistance to *Verticillium dahliae* [J] . *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (12) : 3997.
- [45] Hu Q, Zhu LF, Zhang XN, et al. *GhCPK33* negatively regulates defense against *Verticillium dahliae* by phosphorylating *GhOPR3* [J] . *Plant Physiol*, 2018, 178 (2) : 876-889.
- [46] Xiong XP, Sun SC, Zhang XY, et al. *GhWRKY70D13* regulates resistance to *Verticillium dahliae* in cotton through the ethylene and jasmonic acid signaling pathways [J] . *Front Plant Sci*, 2020, 11: 69.
- [47] Du XM, Huang G, He SP, et al. Resequencing of 243 diploid cotton accessions based on an updated A genome identifies the genetic basis of key agronomic traits [J] . *Nat Genet*, 2018, 50 (6) : 796-802.
- [48] 吴新海, 孙景合, 王秀萍, 等. 耐盐鉴定基质对棉花种子萌发的影响 [J] . *安徽农业科学*, 2011, 39 (6) : 3206-3207, 3209.
- Wu XH, Sun JH, Wang XP, et al. Effects of testing substrates on cotton seed germination in identification of salt tolerance [J] . *J Anhui Agric Sci*, 2011, 39 (6) : 3206-3207, 3209.
- [49] Su Y, Guo AH, Huang Y, et al. *GhCIPK6a* increases salt tolerance in transgenic upland cotton by involving in ROS scavenging and MAPK signaling pathways [J] . *BMC Plant Biol*, 2020, 20 (1) : 421.
- [50] Chinnusamy V, Zhu JH, Zhu JK. Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance [M] // *Genetic Engineering: Principles and Methods*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2006: 141-177.
- [51] Santosh Kumar VV, Verma RK, Yadav SK, et al. CRISPR-Cas9 mediated genome editing of *drought and salt tolerance* (*OsDST*) gene in *indica* mega rice cultivar MTU1010 [J] . *Physiol Mol Biol Plants*, 2020, 26 (6) : 1099-1110.
- [52] Sun ZW, Li HL, Zhang Y, et al. Identification of SNPs and candidate genes associated with salt tolerance at the seedling stage in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J] . *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1011.
- [53] Turner NC, Hearn AB, Begg JE, et al. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) : physiological and morphological responses to water deficits and their relationship to yield [J] . *Field Crops Res*, 1986, 14: 153-170.
- [54] Yu L, Li ZS, Ding X, et al. Developing an efficient CRISPR-dCas9-TV-derived transcriptional activation system to create three novel cotton germplasm materials [J] . *Plant Commun*, 2023, 4 (4) : 100600.
- [55] Pasapula V, Shen GX, Kuppu S, et al. Expression of an *Arabidopsis* vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (*AVP1*) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions [J] . *Plant Biotechnol J*, 2011, 9 (1) : 88-99.
- [56] Mittal A, Gampala SSL, Ritchie GL, et al. Related to ABA-Insensitive3 (*ABI3*) / *Viviparous1* and *AtABI5* transcription factor coexpression in cotton enhances drought stress adaptation [J] . *Plant Biotechnol J*, 2014, 12 (5) : 578-589.
- [57] Liu GZ, Li XL, Jin SX, et al. Overexpression of rice *NAC* gene *SNAC1* improves drought and salt tolerance by enhancing root development and reducing transpiration rate in transgenic cotton [J] . *PLoS One*, 2014, 9 (1) : e86895.
- [58] Shen GX, Wei J, Qiu XY, et al. Co-overexpression of *AVP1* and *AtNHX1* in cotton further improves drought and salt tolerance in transgenic cotton plants [J] . *Plant Mol Biol Report*, 2015, 33 (2) : 167-177.
- [59] Yu LH, Wu SJ, Peng YS, et al. *Arabidopsis* EDT1/HDG11 improves drought and salt tolerance in cotton and poplar and increases cotton yield in the field [J] . *Plant Biotechnol J*, 2016, 14 (1) : 72-84.

- [60] Li YL, Chen M, Khan AH, et al. Histone H3 lysine 27 trimethylation suppresses jasmonate biosynthesis and signaling to affect male fertility under high temperature in cotton [J]. *Plant Commun*, 2023, 4 (6) : 100660.
- [61] Sun L, Alariqi M, Wang YX, et al. Construction of host plant insect-resistance mutant library by high-throughput CRISPR/Cas9 system and identification of A broad-spectrum insect resistance gene [J]. *Adv Sci*, 2024, 11 (4) : e2306157.
- [62] Akhtar S, Shahid AA, Shakoor S, et al. Tissue specific expression of bacterial cellulose synthase (Bcs) genes improves cotton fiber length and strength [J]. *Plant Sci*, 2023, 328: 111576.
- [63] McGaughey WH, Whalon ME. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins [J]. *Science*, 1992, 258 (5087) : 1451-1455.
- [64] Chen ZJ, Scheffler BE, Dennis E, et al. Toward sequencing cotton (*Gossypium*) genomes [J]. *Plant Physiol*, 2007, 145 (4) : 1303-1310.
- [65] Zhu SH, Li YJ, Zhang XY, et al. *GhAlaRP*, a cotton alanine rich protein gene, involves in fiber elongation process [J]. *Crop J*, 2021, 9 (2) : 313-324.
- [66] Chen YZ, Fu MC, Li H, et al. High-oleic acid content, nontransgenic allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) generated by knockout of *GhFAD2* genes with CRISPR/Cas9 system [J]. *Plant Biotechnol J*, 2021, 19 (3) : 424-426.
- [67] Dowd MK, Boykin DL, Meredith WRJ, et al. Fatty acid profiles of cottonseed genotypes from the national cotton variety trials [J]. *The Journal of Cotton Science*, 2010, 14 (2) : 64-73.
- [68] 刘丽, 王玉美, 赵彦朋, 等. 棉花脂肪酸合成酶基因 *GhKAR* 和 *GhENR* 表达载体构建及其功能初探 [J]. *棉花学报*, 2016, 28 (6) : 527-537.
- Liu L, Wang YM, Zhao YP, et al. Construction of expression vectors and a preliminarily functional analysis of fatty acid synthetase genes of *GhKAR* and *GhENR* in upland cotton [J]. *Cotton Sci*, 2016, 28 (6) : 527-537.
- [69] Lin JL, Fang X, Li JX, et al. Dirigent gene editing of gossypol enantiomers for toxicity-depleted cotton seeds [J]. *Nat Plants*, 2023, 9 (4) : 605-615.
- [70] Wang YL, Meng ZG, Liang CZ, et al. Increased lateral root formation by CRISPR/Cas9-mediated editing of arginase genes in cotton [J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60 (5) : 524-527.
- [71] Ma HH, Wu YL, Lv RL, et al. Cytochrome P450 mono-oxygenase CYP703A2 plays a central role in sporopollenin formation and *ms5ms6* fertility in cotton [J]. *J Integr Plant Biol*, 2022, 64 (10) : 2009-2025.
- [72] Zhu XQ, Xu ZP, Wang GY, et al. Single-cell resolution analysis reveals the preparation for reprogramming the fate of stem cell niche in cotton lateral meristem [J]. *Genome Biol*, 2023, 24 (1) : 194.
- [73] Bisaria N, Jarmoskaite I, Herschlag D. Lessons from enzyme kinetics reveal specificity principles for RNA-guided nucleases in RNA interference and CRISPR-based genome editing [J]. *Cell Syst*, 2017, 4 (1) : 21-29.
- [74] Wu XB, Scott DA, Kriz AJ, et al. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32 (7) : 670-676.
- [75] Kawamata M, Suzuki HI, Kimura R, et al. Optimization of Cas9 activity through the addition of cytosine extensions to single-guide RNAs [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2023, 5 (7) : 672-691.
- [76] Latella MC, Di Salvo MT, Cocchiarella F, et al. *In vivo* Editing of the Human Mutant Rhodopsin Gene by Electroporation of Plasmid-based CRISPR/Cas9 in the Mouse Retina [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, 5 (11) : e389.
- [77] Tang XF, Wang Z, Zhang Y, et al. Non-viral nanocarriers for CRISPR-Cas9 gene editing system delivery [J]. *Chem Eng J*, 2022, 435: 135116.
- [78] Yang ZX, Fu YW, Zhao JJ, et al. Superior fidelity and distinct editing outcomes of SaCas9 compared to SpCas9 in genome editing [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2022: S1672-S0229 (22) 00168-1.
- [79] Hu JH, Miller SM, Geurts MH, et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity [J]. *Nature*, 2018, 556 (7699) : 57-63.
- [80] Waltz E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation [J]. *Nature*, 2016, 532 (7599) : 293.
- [81] Zhang DB, Hussain A, Manghwar H, et al. Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective [J]. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18 (8) : 1651-1669.
- [82] 中华人民共和国农业农村部. 农业用基因编辑植物安全评价指南 (试行) [EB/OL]. (2022-01-24). http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/sbzn/202201/t20220124_6387561.htm. Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Guidelines for safety evaluation of gene-edited plants for agricultural use (Trial) [EB/OL]. (2022-01-24). http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/sbzn/202201/t20220124_6387561.htm.
- [83] Ji X, Yang B, Wang DW. Achieving plant genome editing while bypassing tissue culture [J]. *Trends Plant Sci*, 2020, 25 (5) : 427-429.
- [84] Ge XY, Xu JT, Yang ZE, et al. Efficient genotype-independent cotton genetic transformation and genome editing [J]. *J Integr Plant Biol*, 2023, 65 (4) : 907-917.