



棉花遗传转化和基因编辑研究进展与展望

余露, 易玉贞, 张献龙, 金双侠*

华中农业大学作物遗传改良全国重点实验室, 湖北洪山实验室, 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

* 联系人, E-mail: jsx@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2025-08-12; 接受日期: 2025-10-28; 网络版发表日期: 2026-01-09

农业生物育种科技创新2030-重大项目(批准号: 2023ZD04074-3)和国家自然科学基金(批准号: 32501992, 32325039)资助

摘要 棉花是全球重要经济作物, 其遗传改良对提升纤维品质、抗逆性和产量至关重要. 陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)作为主要栽培种, 其异源四倍体(AADD)基因组复杂且基因高度冗余, 严重制约了传统基因功能解析与育种效率的提升. 近年来, 随着高质量基因组测序的完成、遗传转化技术的突破及基因编辑工具的革新, 棉花功能基因组研究与精准分子育种迎来了前所未有的机遇. 本文系统梳理了该领域最新进展, 主要包括: (i) 针对遗传转化基因型依赖瓶颈, 总结高效受体材料(如Jin668)及连续再生驯化(SRA)策略的应用突破; (ii) 聚焦我国主导开发的多维度编辑工具系统(CRISPR-Cas9/12/13核酸酶、碱基编辑器、表观编辑器等), 阐释这些工具在基因敲除与表达精准调控方面的应用, 并介绍了配套建立的全基因组脱靶效应评估体系; (iii) 基于上述技术, 系统性构建了覆盖纤维品质、生物/非生物抗性以及棉籽改良等多维性状的5000余个基因的突变体库, 该资源库以标准化的可遗传材料为基础, 依托开放共享的种质与数据平台, 为基因功能解析与育种创新提供了重要资源支撑; (iv) 深入剖析当前面临的关键技术挑战, 包括转化效率瓶颈、脱靶风险、多倍体编辑复杂性及组织再生障碍; (v) 展望未来发展方向, 如新型递送系统开发、更高精准度编辑工具的创新、复杂性状调控网络的靶向编辑策略, 以及基因编辑棉花品种产业化的推进路径. 本文旨在为棉花生物育种技术的革新与突破性品种的培育提供系统的理论参考和实践指引.

关键词 陆地棉, 遗传转化, CRISPR/Cas系统, 基因递送, 育种改良

棉花(*Gossypium* spp.)是最重要的经济作物之一, 维系着全球超过1亿农业人口的生计, 支撑着逾2500亿美元的纺织产业链. 其种子是重要的油料与蛋白来源, 副产物在精细化工领域亦具战略价值. 然而, 日益严峻的生物与非生物胁迫持续造成严重经济损失, 直接威胁全球棉花产业的稳定与发展. 传统杂交育种在棉花遗传改良中曾发挥重要作用, 但受限于种质资源狭窄、育种周期长及性状连锁等固有障碍, 难以进一

步突破产量与抗性瓶颈.

棉花生物育种面临的深层挑战根植于其复杂的基因组特性. 作为主要栽培种, 陆地棉(*Gossypium hirsutum*)为异源四倍体(AADD), 基因组庞大(~2.5 Gb), 重复序列比例高达65%~69%. At与Dt亚基因组间存在广泛的基因复制与功能冗余, 极大地阻碍了关键性状基因的精准解析. 现代栽培种遗传基础狭窄, 全基因组重测序分析显示品种间遗传相似度过98.7%, 核心

引用格式: 余露, 易玉贞, 张献龙, 等. 棉花遗传转化和基因编辑研究进展与展望. 中国科学: 生命科学, 2026, 56: 1079–1095

Yu L, Yi Y Z, Zhang X L, et al. Genetic transformation and gene editing in cotton: advances and prospects (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2026, 56: 1079–1095, doi: 10.1360/SSV-2025-0249

种质的遗传多态性仅为野生棉的1/3, 导致抗逆性提升困难与遗传增益饱和^[1,2]。棉属包括50多个物种, 其中仅有4个被成功驯化为栽培种^[3]。现存种质资源中, 野生棉占比不足15%, 其携带的珍贵抗性基因因种间生殖隔离难以通过常规杂交有效利用, 限制了种质创新潜力。随着棉花基因组与重测序数据的积累, 研究重心正从遗传基础解析转向基因组时空调控机制的阐明。在此背景下, 亟需推动棉花ENCODE等项目, 整合单细胞时空组学技术以系统解析基因调控网络, 并结合多组学、基因编辑与人工智能等方法, 最终实现基因组学驱动的精准育种^[4]。

为实现棉花关键性状的定向改良与产业可持续发展, 必须依赖高效、精准的现代分子育种技术作为支撑。遗传转化技术是实现目标基因(内源编辑或外源导入)与基因组整合的关键桥梁, 是性状定向改良的基础^[5]。基因编辑技术能够靶向修饰基因组, 有效克服多倍体冗余, 快速创制新种质。因此, 系统攻克遗传转化效率低、基因型依赖性强等技术瓶颈, 建立稳定、高效的基因编辑平台, 已成为培育抗逆优质棉花新品种的核心路径。

1 棉花遗传转化技术的研究进展

遗传转化与植株再生是获得转基因/基因编辑植株的核心环节, 其效率直接影响分子育种进程。植物体细胞再生依赖于细胞的多能性和全能性, 主要包括器官发生或体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis, SE)两种途径^[6,7]。根据递送机制, 现有技术可分为间接递送(如农杆菌介导法^[8,9]、病毒载体法等^[10~14])和直接递送(如基因枪法^[15,16]、花粉管通道法^[17]、纳米颗粒转化^[18,19]等)两大类。

1.1 农杆菌介导法

农杆菌介导法(*Agrobacterium*-mediated transformation, AMT)是目前应用最广泛的遗传转化技术。该技术利用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)或发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)的Ti/Ri质粒系统, 将外源基因导入植物细胞, 并诱导其产生再生芽或发根(毛状根)。其中, 根癌农杆菌介导的T-DNA单/低拷贝整合更有利于外源基因在后代中的稳定表达^[20~22]。该技术通常以离体组织(如无菌种子的下胚轴)为受体,

通过农杆菌侵染将外源DNA精准整合至植物基因组, 从而在获得的转基因植株中实现目标基因与内源基因的同时表达^[23]。其流程主要包括: 载体构建、农杆菌共培养、抗性筛选和植株再生等步骤(图1)。

然而, AMT在棉花中仍面临三大关键瓶颈。(i) 基因型强依赖性: 棉花体细胞再生主要依赖SE, 该过程受基因型严格调控^[24,25]。不同棉种及品种间再生能力差异显著, 如陆地棉(*G. hirsutum*)>亚洲棉(*G. arboreum*)>海岛棉(*G. barbadense*)>非洲棉(*G. africanum*); 珂字棉的胚性愈伤诱导率约为35%, 而新陆早45号则低于10%。(ii) 转化周期冗长: 基于SE途径的完整转化过程通常需6~8个月。(iii) 菌株侵染效率差异: 不同农杆菌菌株的侵染活性显著影响转化成功率^[26,27]。

1.2 非组培遗传转化体系

非组培遗传转化体系利用植物自身的再生能力(如分生组织、生殖器官), 规避了对传统组织培养依赖, 为难以转化的棉花基因型提供了新策略^[28,29]。

1.2.1 生物载体介导技术

生物载体介导技术是指利用根癌农杆菌等活体微生物作为载体, 将其T-DNA区携带的外源基因导入并整合到植物基因组中的技术。Gurusaravanan等人^[30]首次在TM-1、中棉所49等顽固基因型中实现转化, 但转化效率较低且易产生嵌合体。Cui等人^[31]利用发根农杆菌侵染ZM-24子叶诱导毛状根再生, 建立了幼苗快速遗传转化体系。Ge等人^[32]开发的农杆菌-超声波协同体系SMT(shoot apical meristem cell-mediated transformation)靶向棉花种子顶端分生组织干细胞, 并结合壮观霉素抑制主芽以诱导腋芽发生, 将顽固基因型(如TM-1)的转化效率提高了3~5倍, 且GFP报告基因可稳定遗传三代, 嵌合体比例显著降低。

1.2.2 物理或化学递送技术

(1) 花粉管通道法。花粉管通道法是利用受精过程中花粉管形成的物理通道, 将外源DNA直接递送至胚囊并整合至受精卵或早期胚胎基因组^[17,33~35]。因其无需组织培养, 其转化过程不受基因型限制。在棉花中主要采用子房注射法, 并已成功培育出多个转基因品种, 但仍面临转化效率不稳定、筛选流程繁琐、假阳性率高等问题^[36,37]。

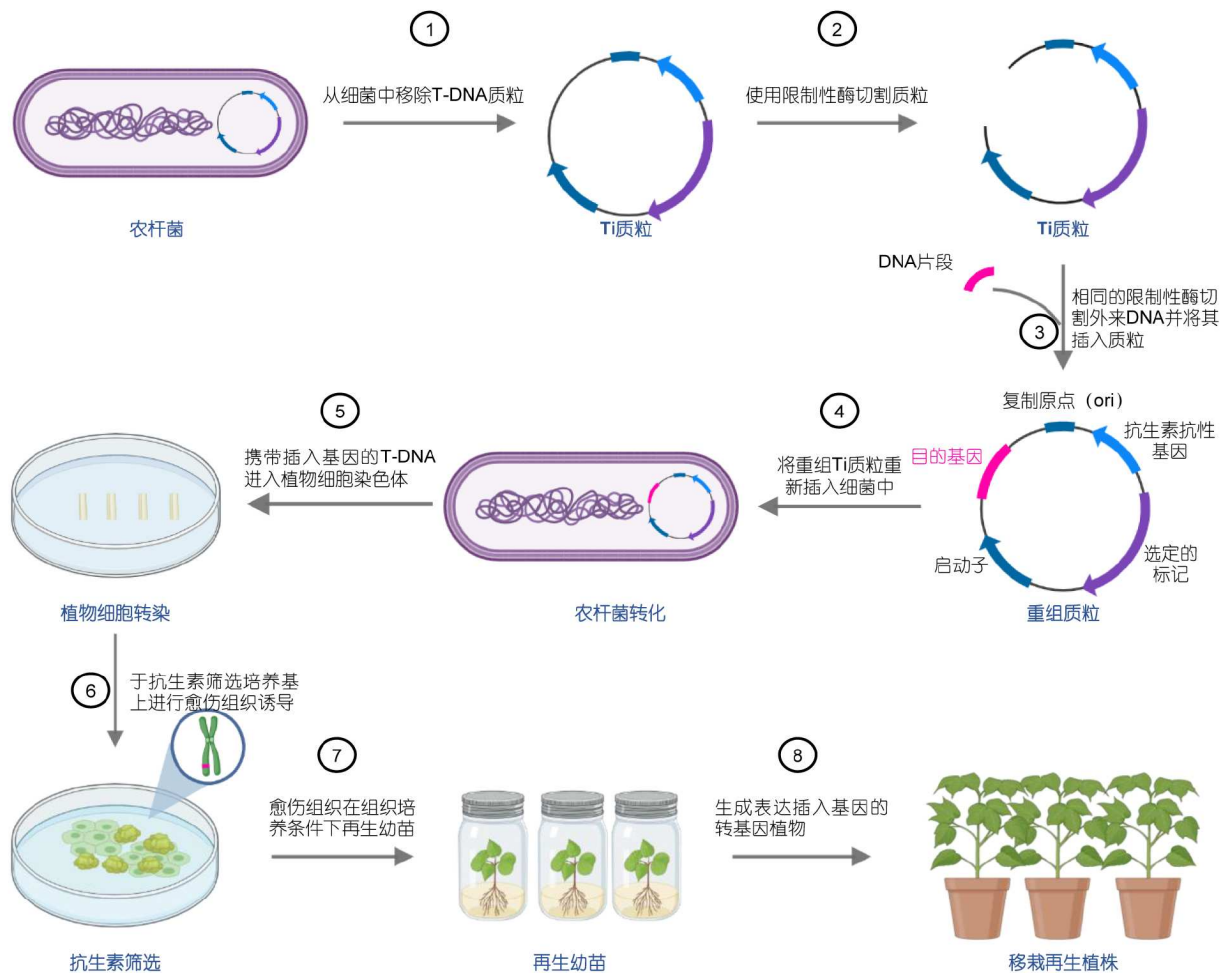


图 1 农杆菌介导棉花遗传转化流程. ①从农杆菌中切除Ti质粒, 并使用限制性核酸内切酶消化; ②使用相同的限制性内切酶酶切目标基因片段; ③通过同源重组将 Ti 质粒与目标基因连接; ④将重组Ti质粒重新导入细菌中; ⑤携带重组质粒的农杆菌菌液侵染棉花下胚轴; ⑥在抗生素筛选培养基上诱导愈伤组织; ⑦于组织培养条件下使愈伤组织再生为幼苗; ⑧再生苗移栽

Figure 1 The process of *Agrobacterium*-mediated cotton genetic transformation. ① Excision of the Ti plasmid from *Agrobacterium* and digestion with a restriction endonuclease; ② digestion of the target gene using the same restriction enzyme; ③ integration of the Ti plasmid and the target gene via homologous recombination; ④ introduction of the recombinant Ti plasmid back into *Agrobacterium*. ⑤ co-cultivation of cotton hypocotyls with the recombinant *Agrobacterium* for genetic transformation; ⑥ callus induction on antibiotic selection medium; ⑦ regeneration of plantlets from callus under tissue culture conditions; ⑧ transplantation of regenerated plantlets

(2) 基因枪法. 基因枪法是通过动力加速将吸附DNA的金属微粒射入细胞, 以实现外源DNA的整合, 其转化效率约0.2%~4.0%^[5]. Finer和McMullen^[15]利用该技术将潮霉素抗性基因导入棉花胚性细胞并获得抗性植株. 后续研究通过优化轰击参数、筛选适宜受体(如下胚轴、茎尖分生组织)及采用分步筛选策略, 进一步提高了转化效率^[38]. 然而, 该方法存在多拷贝插入率高、设备成本高昂, 以及潜在的基因组损伤与基因重排风险, 限制了其规模化应用^[39].

(3) 纳米材料递送. 纳米材料递送技术(nanoparticle-mediated delivery, NMT)利用磁性纳米颗粒、碳纳米管(carbon nanotube, CNT)、DNA纳米结构等载体克服细胞壁屏障, 将基因精准递送至细胞核或特定细胞器^[40,41]. Zhao等人^[35,42]利用磁性纳米颗粒穿透棉花花粉壁, 将质粒DNA递送至花粉内, 最终获得了可稳定遗传的转基因种子, 将育种周期缩短至约6个月. Demirer等人^[43]开发的CNT平台可高效递送质粒DNA或基因编辑工具(如clustered regularly interspaced short

palindromic repeats and CRISPR-associated protein 9, CRISPR/Cas9),至棉花原生质体,实现无外源基因整合的精准编辑,且未观察到细胞毒性。然而,该技术在植物应用中仍面临两大挑战。(i)遗传稳定性低:多为瞬时表达,难以获得稳定转化株系;(ii)再生效率低下,缺乏高效再生体系。未来可通过共递送再生相关基因(如*BBM*和*Wus2*)以激活细胞全能性;同时,优化纳米材料的表面修饰及递送参数(如粒径、电荷、浓度)来提升转化与再生效率^[40,44,45]。

1.2.3 病毒递送系统:从基因沉默到CRISPR编辑

病毒递送系统是以改造后的病毒颗粒为载体,将目的基因导入特定细胞的高效生物递送技术。

(1) VIGS技术的应用与局限。病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)是基于植物转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)机制,利用重组病毒载体如马铃薯X病毒(potato virus X, PVX)、烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRV)递送靶基因片段,实现基因功能的快速鉴定^[46]。该技术具有操作简便(农杆菌浸润或病毒汁液接种)与周期短(2~4周)等优势^[47]。

(2) 病毒递送CRISPR系统的突破性策略。为克服载体容量与宿主限制,已开发多种策略。分步递送是一种常见策略,即先创制稳定表达Cas9的转基因植物,再利用病毒载体如PVX、大麦黄条点花叶病毒(barley yellow striate mosaic virus, BYSMV)、苦苣菜黄网病毒(*Sonchus yellownet virus*, SYNIV)等分别递送gRNA,从而在受体植物中实现基因编辑^[12,48,49]。此外,利用植物开花控制基因*FT*(*FLOWER LOCUS T*)协助病毒移动,并结合SYNV、番茄斑萎病毒(tomato spotted wilt virus, TSWV)等大容量载体靶向植物分生组织,可在不依赖组织培养、且不残留转基因成分的条件下,直接创制可遗传的编辑种质^[12]。

然而,病毒递送CRISPR仍面临以下挑战。(i)递送效率低,分生组织靶向效率通常低于20%,且能稳定遗传的编辑株系较少;(ii)宿主兼容性差,多数病毒载体不适用于棉花等非宿主植物,例如,BSMV仅适用于禾本科^[50];(iii)存在潜在生物安全风险,约15%~30%的病毒载体可能将其部分遗传物质整合至宿主基因组;(iv)载体容量有限,多数病毒载体最大负载<1 kb,难以递送如CRISPR/Cas9等大片段工具,且存在通量

与宿主范围限制^[51~53]。此外,其他替代技术如聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导法,也因棉花原生质体再生体系不完善、体细胞胚发生频率低而难以实现稳定遗传与规模化应用^[54]。

1.3 棉花遗传转化效率的关键调控因素与优化方案

棉花遗传转化效率受基因型依赖性、选择标记系统、外植体类型、培养体系等多重因素共同调控,是制约功能基因组研究与分子育种应用的关键瓶颈。优化上述因素是提升转化成功率的核心路径。

1.3.1 基因型依赖性突破

非基因型依赖的普适性转化体系的核心特征在于其能够克服受体特定基因型的限制,实现在多种遗传背景的棉花品种中高效应用。建立此类体系是突破棉花遗传转化瓶颈的关键方向。Jin等人^[8]通过系统筛选获得高转化效率(>90%)的受体材料YZ-1,但其农艺性状不理想。Li等人^[24]以主栽品种Y668为基础,通过连续再生驯化(sequential regeneration acclimation, SRA)策略创制出高效通用的受体材料Jin668,其转化效率达90%,目前已被全球60余家机构用于5000余个基因的转化。Zhu等人^[55]基于单细胞测序分析,揭示Jin668的强再生能力与生长素信号通路(*GhARF5*和*GhPIN1*)和干细胞重编程因子(*GhWUS*和*GhBBM*)的早期激活密切相关。Xu等人^[56]完成Jin668的端粒到端粒(telomere-to-telomere, T2T)基因组组装,系统解析了该材料高效再生机制,为非基因型依赖的普适性转化体系的建立提供重要理论依据。

实现普适转化的关键路径包括:精确调控激素(生长素/细胞分裂素)平衡、优化再生转录因子(如*WUS*/*BBM*)表达、靶向表观标记解除抑制,以及借鉴生长调节因子GRF(growth regulating factor)-生长调节因子互作因子GIF(GRF-interacting factor)嵌合体策略激活体细胞全能性(其有效性已在其他作物中得到验证)^[57~60]。这些系统性探索为棉花普适性高效遗传转化体系的建立提供了关键理论依据与技术支持。

1.3.2 筛选标记基因的优化策略

筛选标记基因的合理使用是影响棉花遗传转化的另一关键因素^[61]。传统抗生素筛选系统如新霉素磷酸

转移酶II(neomycin phosphotransferase II, NPTII)和潮霉素磷酸转移酶(hygromycin B phosphotransferase, HPT)可实现约20%的转化效率, 但存在筛选浓度敏感、易产生逃逸株或嵌合体等问题^[62]. 无标记筛选系统(如双T-DNA、转座子等)可避免外源标记基因的引入, 但效率普遍较低(0.2%~0.7%)且操作流程较为繁琐^[63]. 近年来, CRISPR检测技术SHERLOCK(specific high-sensitivity enzymatic reporter unLOCKing)、等温核酸扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)等新型快速、高灵敏度的分子检测技术^[64], 为阳性植株的高效精准筛选提供了新思路, 有望优化标记筛选流程.

1.3.3 外植体转化效率的系统评估

外植体类型与培养体系的优化是建立高效系统的基石. 研究表明, 未成熟组织(如幼嫩芽尖、胚轴)的转化效率通常优于成熟组织. 其中, 茎尖分生组织再生潜能最高, 利用5日龄茎尖通过农杆菌介导转化可获得高达76%的转化再生率^[65]. 胚胎轴通过器官发生途径的再生率约为3.5%, 其转化效率优于下胚轴和胚芽^[66,67]. 不同外植体对转化方法的响应存在差异: 茎尖更适宜农杆菌转化, 而胚轴对基因枪轰击适应性良好. 未来需建立标准化的外植体-转化方法适配体系(如茎尖-农杆菌、胚胎轴-基因枪), 以系统性提升转化效率与可重复性.

2 基因编辑技术: 精准设计育种的范式革新及其在棉花中的进展

2.1 基因编辑技术的发展历程

基因编辑技术历经三代演进: 从锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和规律成簇间隔短回文重复序列及其相关蛋白系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein, CRISPR/Cas). 这些系统均通过在基因组特定定位点诱导DNA双链断裂(double-strand breaks, DSB), 并依赖细胞自身的非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组修复(homology-directed repair, HDR)实现基因编辑^[68,69]. 然而, ZFN存在脱靶率较高、载体构建复杂等局限,

TALEN亦面临操作繁琐的瓶颈, 制约它们在棉花等作物中的广泛应用^[70]. CRISPR/Cas系统凭借单个向导RNA(single guide RNA, sgRNA)引导的精准靶向、多位点编辑及操作简便等优势^[71], 迅速成为棉花基因编辑的主流工具.

2.2 基因编辑技术的精准性优势

基因编辑(genome editing)技术通过人工核酸酶系统在基因组特定位点实现精准修饰(如插入/缺失/替换等), 彻底革新了植物遗传改良范式. 以CRISPR/Cas系统为代表的第三代技术, 利用sgRNA引导Cas蛋白对靶DNA位点进行精确切割或修饰, 推动育种从“随机诱变”向“精准设计”跃迁. 其核心优势在于: (i) 靶向精准性. 可针对启动子、内含子或编码区等特定功能区域编辑, 精确调控基因表达或蛋白功能. (ii) 编辑模式灵活性. 支持基因敲除、碱基替换、片段插入、转录激活等多种操作, 突破传统转基因的过表达局限. (iii) 多基因协同编辑能力. 能够同步靶向多个位点, 克服性状连锁障碍, 实现复杂农艺性状协同优化. 该技术为棉花复杂基因组(多倍体、大基因组)的定向改良提供革命性工具, 在纤维品质、抗逆性等关键性状的精准调控中展现巨大潜力.

2.3 棉花中CRISPR/Cas介导的基因编辑技术: 体系建立、优化与应用

2.3.1 CRISPR/Cas9体系的建立与优化

CRISPR/Cas9系统通过sgRNA引导Cas9蛋白靶向基因组特定位点, 利用其HNH和RuvC结构域切割DNA双链形成DSB, 依赖易错的NHEJ进行修复, 导致目标基因功能丧失^[72](图2A). 该技术的建立与持续优化是棉花基因编辑研究取得突破的关键基础. Wang等人^[73,74]基于pRGEB32载体, 利用棉花内源启动子pGhU6.9构建优化载体pRGEB32-GhU6.9-NPTII, 并通过tRNA-sgRNA自剪切系统实现双sgRNA表达, 在受体材料Jin668中实现了对靶基因*DsRed2*和*GhCLA*的高效编辑, 编辑效率66.7%~100%. Long等人^[75]采用GhU6.3启动子提升sgRNA表达水平, 显著提高瞬时表达的编辑效率. Chen等人^[76]通过原生质体编辑*GhCLA1/GhVP*验证有效性, 稳定转化植株突变率达47.6%~81.8%. Gao等人^[77]开发基于TM-1受体的CRISPR/Cas9瞬时验证体系并建立农杆菌-GUS瞬时

系统用于载体预筛, 证实sgRNA对*GhPDS*等基因的编辑以碱基缺失为主, 编辑效率约为64%。Li等人^[78]利用菜豆矮缩病毒(bean dwarf virus, BeYDV)滚环复制元件改良编辑系统, 将sgRNA插入复制环后显著提升编辑效率(*GhCLA1*纯合突变效率达73.3%, *DsRed2*敲入效率约6%)。Li等人^[79]基于全基因组测序评估发现, 棉花编辑后代中存在的数千个SNP(single nucleotide polymorphism)/Indels主要源于亲本差异或组培过程的体细胞变异, 远超过CRISPR/Cas9引起的脱靶位点, 证实该系统具有高度特异性且脱靶率极低。上述研究为棉花中进行定点敲除的功能基因验证提供了精准高效的工具。

2.3.2 棉花新型基因编辑衍生工具的突破

(1) 单碱基编辑器的建立与应用. 针对棉花基因组高度同源等位基因间常仅存在少数SNP, 传统CRISPR/Cas9难以实现等位基因特异性点突变的难题, 华中农业大学棉花团队在单碱基编辑领域取得系列重要突破。Wang等人^[80]将保留单链切割能力的核酸酶缺陷型Cas9(nickase Cas9, nCas9)或完全丧失切割能力的失活型Cas9(dead Cas9, dCas9)与不同腺苷脱氨酶变体融合, 构建了靶点范围拓展的系列腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE), 包括GhABE6.3n/d, 7.8n/d, 7.9n/d, 7.10n/d及GhABE7.10n-dCpf1等(图2B)。高通量测序结果表明, GhABE7.10n表现出最高的编辑效率(单株效率达64%), 且全基因组及转录组测序均未检测到DNA或RNA水平的脱靶效应。随后, Wang等人^[81]通过优化腺嘌呤脱氨酶, 建立了高效的碱基编辑器GhABE-8e, 其编辑效率高达99%; 通过对*GhTFL1*基因进行高密度饱和碱基突变, 创制出系列具有连续表型变异的突变体材料。Qin等人^[82]通过融合nCas9、胞嘧啶脱氨酶APOBEC1及尿嘧啶糖基化酶抑制剂UGI, 成功建立了首个棉花胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE)GhBE3(图2C)。该系统在*GhPEBP*和*GhCLA*等关键基因的编辑中实现了高达57.78%的C-to-T转换效率(与水稻、拟南芥相当), 且多位点同步编辑效率高。全基因组深度测序在1500个预测脱靶位点均未检出突变, 证实其具有高度特异性。这些单碱基编辑工具的建立为棉花新遗传位点发掘及SNP精准育种提供高效平台。

(2) 转录激活系统的建立与应用. 精确上调基因表

达是功能研究与性状改良的重要策略。传统的过表达策略受限于载体容量与调控元件, 而基于CRISPR/dCas9的转录激活技术为实现多基因协同调控提供了新途径^[83]。Yu等人^[84]系统评估了转录激活因子VP64(由四个串联拷贝的单纯疱疹病毒VP16激活结构域组成)、TAL(transcription activator-like effectors)、植物特异性激活域EDLL与dCas9融合效果, 成功建立适用于棉花的dCas9-TV系统(图2D)。利用该系统激活基因*GhTULP34*和*GhTLP19*, 其转录水平分别最高上调35.5倍和30.5倍; 激活*GhPAPID*基因后转录水平最高上调41.7倍, 并伴随原花青素/花青素显著积累, 棉株呈现红/紫色表型; 通过激活*GhEPSP*基因, 成功创制出草甘膦抗性材料, 其表达量上调2.9~33.5倍, 且抗性可稳定遗传。这一工具为同步上调多基因表达提升棉花复合抗性、激活代谢合成通路等提供了极具潜力的创新策略。基于dCas9的靶向定位能力, 未来可通过将其与不同的DNA甲基化转移酶或组蛋白修饰酶等融合, 实现对目标基因的表观遗传编辑(图2E), 从而在转录层面精准调控基因表达, 为多维度的基因功能研究开辟了新视野。

2.3.3 基于CRISPR/Cas12的基因编辑体系

CRISPR/Cas12系统属于Ⅱ类V型效应蛋白, 仅含一个RuvC样切割结构域, 可在crRNA引导下切割双链DNA, 产生黏性末端(区别于Cas9的平末端)(图2F)。其优势在于突破原间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)为NGG的限制, 显著拓展AT富集区(如启动子)的编辑范围。此外, Cas12核酸酶具有反式切割活性, 可非特异性切割附近的单链DNA(single-stranded DNA, ssDNA), 这一特性已被开发用于高灵敏度的核酸检测技术。

Li等人^[85,86]研究表明, LbCpf1(Cas12a)对棉花内源基因*GhCLA*的编辑效率为20%~60%(与水稻、玉米中的效率相当), 且偏好产生5~12 bp长片段缺失(区别于Cas9通常产生的1~5 bp小片段插入/缺失)。其最适编辑温度为34℃, 该条件下无脱靶效应, 并已成功用于创制非转基因的无腺体棉花材料。Hui等人^[87]建立了PAM位点为VTTV的CRISPR/Mb2Cas12a系统, 可在22~32℃下高效工作, 利用单个载体即可实现8个基因的同时编辑, 展现出强大的多基因编辑能力。Li等人^[88]通过优化内源启动子pGhαGloA驱动crRNA表达,

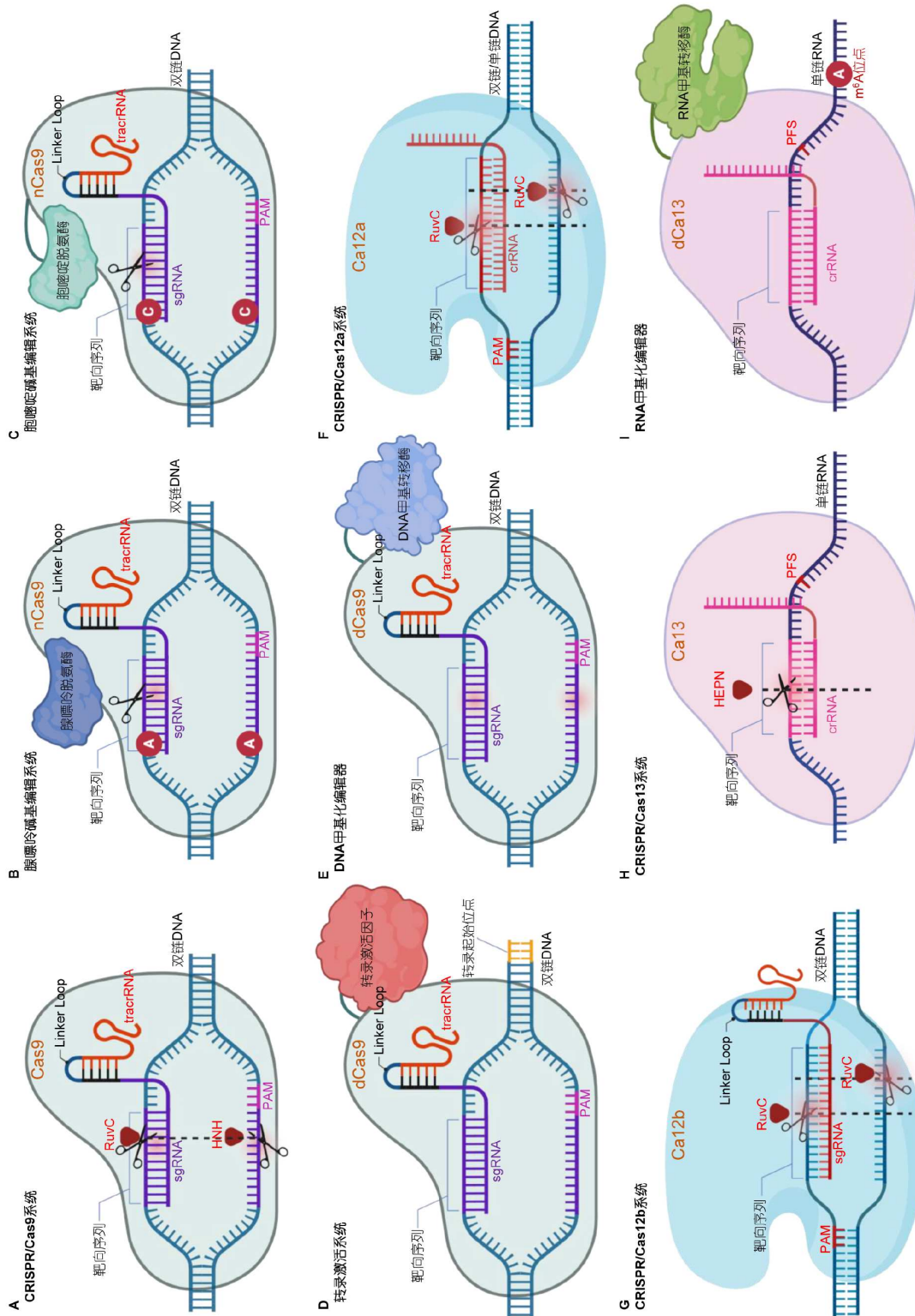


图 2 基于CRISPR/Cas的不同基因编辑系统的工作原理: A: CRISPR/Cas9系统; B: 基于nCas9的腺嘌呤脱氨酶编辑系统; C: 基于nCas9的胞嘧啶脱氨酶编辑系统; D: 基于dCas9的转录激活系统; E: 基于dCas9的DNA甲基化编辑器; F: CRISPR/Cas12a(Cpf1)系统; G: CRISPR/Cas12b(C2c1)系统; H: CRISPR/Cas13系统; I: 基于dCas13的RNA甲基化编辑系统

Figure 2 Schematic diagram of diverse CRISPR/Cas-based gene editing systems. A: CRISPR/Cas9 system; B: ABE using nCas9; C: CBE using nCas9; D: transcriptional activation system employing dCas9; E: DNA methylation editing system based on dCas9; F: CRISPR/Cas12a (Cpf1) system; G: CRISPR/Cas12b (C2c1) system; H: CRISPR/Cas13 system; I: RNA methylation (m⁶A) editing system utilizing dCas13

将针对两个不同靶点的crRNA编辑效率分别提升至93.37%和88.24%。Wang等人^[89]首次构建棉花CRISPR/Cas12b(AacCas12b)系统(图2G), 发现在45℃处理4天的条件下编辑效率最佳, 偏好产生9~14 bp缺失, 在预测脱靶位点没有检测到脱靶事件, 且T₀代产生的编辑能够稳定遗传。该系统已获中国国家发明专利授权, 是我国自主研发的基因编辑核心底盘工具, 填补了该领域技术空白。

2.3.4 基于CRISPR/Cas13的棉花RNA编辑与表观转录组编辑

(1) 基于CRISPR/Cas13的RNA编辑系统。CRISPR/Cas13属于Ⅵ型效应蛋白, 在crRNA引导下特异性切割靶标RNA(图2H)。此外, Cas13还具有反式切割活性, 又称旁切活性(collateral activity)。一旦其被激活, 便可非序列特异性地切割其他单链RNA分子, 导致广泛的RNA降解, 该特性在病原体核酸检测中极具应用潜力。Yu等人^[90]在棉花中首次系统性建立7套CRISPR/Cas13系统, 涵盖Cas13a, b, d, x和y五个亚型。以*GhCLA*和*GhPGF*为靶标评估其编辑效率, 结果表明, Cas13d和Cas13x亚型的编辑更稳定和高效, 编辑效率为40%~80%, 并成功创制出叶绿素/棉酚含量显著降低的新型棉花种质。该工具填补了植物RNA精准编辑工具的空白, 为非编码RNA功能研究和弱突变体创制提供了新策略。

(2) 基于CRISPR/dCas13的表观转录组编辑系统。遗传信息的表达受到复杂调控, RNA上的动态化学修饰(如m⁶A)是调控基因表达的关键因素, 影响mRNA的代谢与功能。通过关键结构域突变获得的失活型Cas13(dead Cas13, dCas13)保留了RNA靶向能力, 但丧失了RNA切割活性。Yu等人^[91]首次在棉花中将dCas13分别与m⁶A甲基化酶(writer)*GhMTA*和去甲基化酶(eraser)*GhALKBH*融合, 构建了新型m⁶A定点编辑工具-甲基化编辑器(TME)与去甲基化编辑器(TDE)(图2I)。针对靶标转录本*GhDi9*和*GhECA1*的特定位点, TME和TDE能在0~46 nt的窗口口范围内有效动态调控m⁶A甲基化水平, 进而影响目标转录本的丰度, 其产生的功能效应与基因敲除或过表达策略相当。这一开创性工作不仅揭示了特定m⁶A修饰的生物学功能, 更为培育耐旱等优良性状的棉花新品种提供了宝贵的基因资源和技术平台。

2.4 CRISPR/Cas技术在棉花生物育种中的应用

CRISPR/Cas技术已广泛应用于棉花多个重要性状的精准改良(图3)。在纤维品质精准提升方面, 研究者们利用CRISPR/Cas9系统靶向编辑关键基因以解析其功能机制: Zhu等人^[92]利用CRISPR/Cas9系统敲除*GhAlaRP*, 证实其通过调节细胞伸长和细胞壁合成影响纤维发育; Zhang等人^[93]通过敲除*Ghlm*, 揭示了该基因在线粒体mRNA的剪接及纤维发育的关键作用; Zhao等人^[94]对纤维起始的关键调控节点*GhMYB25-like*及其自然突变*GhMYB25-like_AthapT*的研究, 阐明了二者通过剂量效应和显性负效应共同决定棉花的绒长起始; Tian等人^[95]则通过敲除*GRF4*抑制独脚金内酯合成, 阐明了该通路对纤维细胞伸长和细胞壁厚度的调控作用。

在油分改良方面, 通过CRISPR/Cas9敲除基因*GhFAD2*或*GhPDCT1*, 可显著提高油酸含量并降低亚油酸比例, 有效提升棉籽油的工业应用价值^[96,97]。Lin等人^[98]针对棉籽中具有生殖毒性的左旋棉酚, 通过特异性敲除控制其合成的关键基因*GhDIR5*, 在保留抗性右旋棉酚的前提下降低左旋棉酚含量, 显著增强了棉籽的食用和饲用安全性。Gao等人^[99]利用CRISPR/Cas9敲除有腺体棉花品种中的*CGPI*基因, 创制出与显性无腺体突变体*GI2e*相似的无腺体表型, 突变体中棉酚等萜类化合物的含量显著降低, 为培育低酚棉品种提供了新途径。

在抗病抗虫及逆境响应方面, 该技术亦发挥重要作用。Zhang等人^[100]利用CRISPR/Cas9编辑*GhI4-3-3*, 增强了棉花对黄萎病的抗性; 多重靶向编辑策略可有效切割棉花卷叶病毒基因组, 抑制病毒危害^[101~104]。Zhang等人^[105]利用CRISPR/Cas9构建lncD09和lncA07的敲除突变体, 发现突变体植株感虫性显著增强, 揭示了lncRNA在虫害防御中的新功能。高通量编辑体系加速了抗虫基因挖掘。Sun等人^[106]利用sgRNA混池建库的方法, 设计了968个sgRNA靶向502个前期鉴定的可能参与棉花抗虫的基因, 获得了含2000多个独立编辑株系的突变体库, 并从中鉴定出广谱抗虫基因*GhMLP423*; Wang等人^[107,108]构建靶向82个*GhCPKs*同源基因的饱和突变体库, 获得518个T₀代突变体, 筛选出*GhCPK33/GhCPK74*等抗虫基因并解析其机制; 另一项研究通过构建*GhGLRs*突变体库, 筛选出三个响应斜纹夜蛾和烟粉虱侵染的关键基因*GhGLR3.4*。



图 3 利用CRISPR/Cas技术进行基因组编辑,旨在培育兼具胁迫抗性与高产性状的棉花新种质

Figure 3 Genome editing via CRISPR/Cas technology aims to develop novel cotton germplasms with combined stress tolerance and high-yield traits

Alariqi等人^[109]利用CRISPR/Cas9敲除基因*Gh4CL3*,发现该基因缺失会削弱木质素合成与茉莉酸信号,进而证实了其抗病性的正向调控功能。Wang等人^[110]借助CRISPR/Cas9敲除突变体,揭示*GhFKBP17-2*基因在棉铃虫侵染过程中调控内质网应激介导的免疫反应。Zhu等人^[111]利用CRISPR/Cas9技术,通过饱和突变绘制了棉花MIR482家族各成员的免疫功能图谱,揭示了其内部的功能冗余与特异性规律。Liu等人^[112]敲除*GhGLR4.8*使高抗品种转为高感,并开发相应分子标记,为抗枯萎病育种提供技术支持。

在非生物胁迫方面,多项研究利用CRISPR/Cas9技术揭示了关键基因的调控功能。Li等人^[113]编辑*GhALKBH10B*通过增加m⁶A修饰水平,增强了棉花的抗旱性。Wang等人^[114]通过同时敲除陆地棉A和D亚基因组精氨酸酶编码基因*Gh_A05G2143*和*Gh_D05G2397*,获得的双基因纯合株系在高氮或低氮条件下侧根生长发育均得到显著提升。Sun等人^[115]发现钙信号通路中同源基因*GhCIPK6*在调控棉花抗旱性上功能存在分化,其中*GhCIPK6D1*突变体抗旱性增强。Wu等人^[116]定位高温诱导表达的恢复基因*GhNSP*,揭

示其调控花粉外壁形成,为耐热育种提供靶点。Zhang等人^[117]结合转录组与基因编辑,鉴定出影响花药开裂的高温响应基因*Ghir_D12G012350*并建立快速鉴定体系。Li等人^[118]通过单细胞多组学结合CRISPR技术验证,揭示*GhCYP703A2*和*GhQRT3*是高温育性的关键正向调控因子,其敲除突变体常温不育。Li等人^[119]还通过精确编辑*GhCKI*启动子(分别使用CRISPR/Cas9和CRISPR/Cpf1),成功培育出耐高温棉花新品系。

在单倍体诱导与发育调控方面,Long等人^[120]通过敲除花粉精细胞特异表达的*GhDMP*,成功创制棉花单倍体诱导系。Deng等人^[121]发现敲除*GhTCE1*导致ROS过度积累,从而抑制愈伤细胞伸长并促进器官发生,揭示了其调控体细胞向全能细胞转变的机制。Zhang等人^[122]证实*GPAT12/25*存在功能冗余,双敲除导致完全雄性不育。Wang等人^[123]则验证了*GhAPI-D3*过表达可促进早熟且不影响产量与纤维品质。

3 棉花遗传转化和基因编辑的局限和挑战

随着基因编辑技术的精准化发展,棉花功能基因

组学研究正逐步深入基因组“暗物质”领域,特别是对小开放阅读框(small ORF, sORF)编码的功能性小肽的解析。植物基因组中广泛存在sORF(如上游uORF或lncRNA中的编码序列),其翻译产物在生长发育中发挥关键调控作用。例如,棉花中的*GhPSK*肽激素能显著促进纤维伸长^[124];新发现的小肽*GbCEP1*通过调控纤维细胞节律性生长影响纤维品质^[125]。然而,由于sORF片段短小,传统敲除技术难以实现其功能验证,亟需单碱基编辑器等精准编辑工具。通过特异性突变sORF起始密码子或在编码区引入提前终止密码子,可有效解析其功能。系统挖掘与验证棉花sORF功能,将为解析复杂性状的精细调控网络提供新视角。

然而,要实现这些精细化编辑目标并推动其广泛应用,仍需克服该领域长期存在的一些核心挑战(图4)。当前技术在实际推广中存在效率与适应性限制,其中棉花再生困难是制约遗传转化的核心瓶颈,导致转化周期长且效率低。现有体系对基因型依赖性强,难以

在农艺性状优良但再生能力弱的栽培品种中广泛应用。其主要限制因素主要包括:(i)缺乏通用高效的再生体系;(ii)现有递送系统(如农杆菌、基因枪)在棉花中的效率仍有待提升,尤其对大片段DNA或复杂载体的递送能力不足;(iii)筛选过程繁琐且耗时。

棉花的异源四倍体(AADD)基因组中,At与Dt亚基因组间存在高度序列相似性,导致基因功能冗余。为实现性状有效改良,通常需同步编辑所有同源拷贝,这显著增加了技术难度^[126]。此外,基因组中大量重复序列及同源基因间的高度相似性,使得设计可精准区分并高效靶向全部目标拷贝的gRNA极具挑战^[74,127,128]。上述因素常导致不同同源拷贝编辑状态不一致,形成嵌合突变,难以获得纯合稳定的多拷贝编辑植株。

除技术瓶颈外,由于棉花基因组庞大复杂,编辑过程中的潜在脱靶效应可能引发非预期有害突变,进而影响其他农艺性状或遗传稳定性,存在潜在的生物安全风险^[68,129]。在全球范围内,基因编辑作物(尤其是

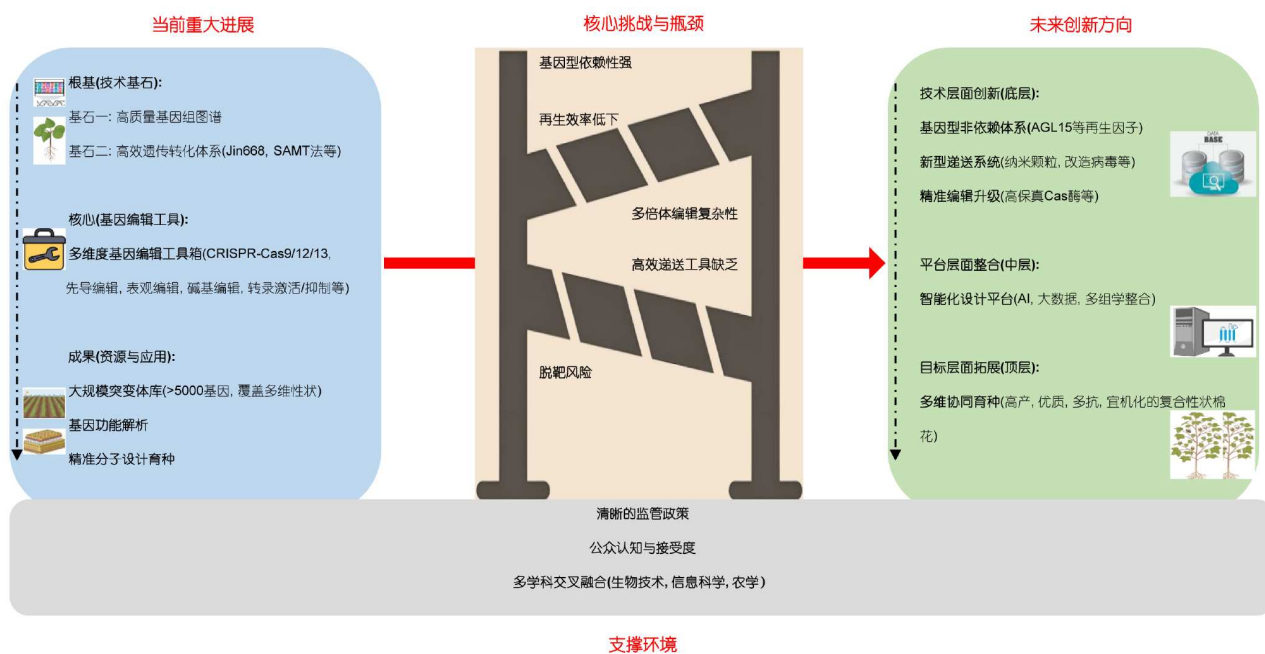


图 4 棉花遗传转化与基因编辑: 发展脉络与前景展望。左栏总结基于高质量基因组与高效遗传转化体系取得的核心进展, 涵盖多维编辑工具开发、规模化突变体库构建及其在基因功能解析与育种中的应用。中栏归纳了当前面临的主要技术瓶颈, 包括基因型依赖性、再生效率低、多倍体编辑复杂性等制约因素。右栏展望了未来重点发展方向, 包括建立基因型非依赖的转化体系、开发新型递送技术、提升编辑精准度, 并通过智能育种平台整合实现多维性状协同改良。该发展路径需以明确的监管规范、公众认知支持与多学科融合为基础支撑

Figure 4 Genetic transformation and gene editing in cotton: a roadmap and future perspectives. The left panel summarizes key advances driven by high-quality genomes and efficient transformation systems; the middle panel outlines persistent technical bottlenecks; the right panel envisions future priorities, including the development of genotype-independent systems and intelligent breeding platforms. This developmental pathway requires supportive regulatory frameworks, public understanding, and multidisciplinary integration

SDN-I类, 即不引入外源DNA的编辑)的监管框架尚未统一, 为其产业化带来不确定性. 现行法规多聚焦于编辑产品的安全性评估, 包括脱靶效应与非预期效应, 并关注其与传统转基因生物的界定. 值得注意的是, “基因编辑”概念在公众认知中易与“转基因”混淆, 可能引发类似疑虑, 进而影响市场接受度与商业化进程.

4 总结与展望

当前, 棉花遗传转化与基因编辑技术的发展机遇与挑战并存, 其未来突破的核心驱动力在于持续的技术创新、多学科交叉融合以及育种过程的智能化升级. 为系统应对现有挑战, 需在技术、资源与育种应用等多个层面进行重点布局.

在关键技术突破层面, 首要任务是建立基因型非依赖的遗传转化体系. 重点发展方向包括: (i) 筛选和利用强再生能力外植体(如分生组织), 并挖掘利用关键再生调控因子. 例如, 本实验室最新研究表明^[56], 过表达再生相关转录因子AGL15能显著促进棉花体细胞胚发生, 为构建基于内源再生因子协同作用的高效遗传转化体系提供了新思路, 这与国际上利用GRF-GIF等嵌合体提升再生效率的研究形成有效互补. (ii) 开发新型高效递送系统, 如改造大容量病毒载体, 结合物理/化学方法(如粒子轰击与纳米材料)以提升递送效率. (iii) 优化筛选流程, 采用可视化标记等策略, 显著提高阳性植株的筛选通量与准确性.

在基因编辑工具研发方面, 我国已从早期的跟踪学习进入并行引领阶段. 针对棉花多倍体基因组特性, 我国主导开发的多维度编辑工具系统(如CRISPR-Cas9/12/13、碱基编辑器、表观编辑器)为复杂性状改良提供了强大支撑. 未来需着力优化gRNA设计策略(如采用特异性更高的长gRNA, 并利用生物信息学工

具严格预测脱靶位点), 完善多重编辑体系, 并积极开发高保真、高活性、PAM范围更广的新型Cas变体, 推动先导编辑等精准编辑技术在棉花中的应用. 相较于国际同行在原始工具创新上的优势, 我国在编辑工具与作物的深度适配及规模化应用上特色鲜明, 未来需继续巩固并扩大这一优势.

在研究体系与育种目标层面, 必须加强棉花关键生物学过程的分子机制解析, 并通过深度整合多组学数据, 构建基因功能与表型关联的综合数据库. 我国已系统性构建了覆盖5000余个基因的突变体库, 其规模与性状覆盖维度已具备国际影响力, 为功能基因组研究奠定了坚实基础. 未来的育种目标应推动从单一追求高产抗逆, 向高产、优质(纤维与棉籽)、多抗(生物与非生物胁迫)、高效营养利用、早熟、宜机化等多维性状协同改良转变. 这一目标既顺应了国际作物育种趋势, 也紧密契合我国棉区的实际生产需求.

综上所述, 棉花遗传转化与基因编辑技术正经历一场深刻变革. 未来的核心任务在于突破基因型依赖与转化效率的限制、攻克多倍体精准编辑的难题, 并深度融合人工智能与大数据技术, 实现育种过程的智能化与精准化. 我国在该领域已展现出强大的应用研发能力与规模优势. 为实现从“并跑”到“领跑”的历史性跨越, 未来需持续加强底层工具的原始创新能力, 深化对关键基因功能与调控网络的解析, 并构建多学科交叉融合的协同创新体系. 同时, 建立科学、明晰、可预测的监管框架, 加强科学传播, 积极提升公众认知与接受度, 这将为技术的顺利落地与产业化营造健康良好的环境. 通过上述系统性的战略布局, 棉花分子设计育种有望加速从实验室走向田间, 为实现全球棉花产业的高产、优质、绿色和可持续发展目标, 贡献坚实的科技支撑与卓有成效的“中国方案”.

参考文献

- 1 Fang L, Wang Q, Hu Y, et al. Genomic analyses in cotton identify signatures of selection and loci associated with fiber quality and yield traits. *Nat Genet*, 2017, 49: 1089–1098
- 2 Yuan D, Grover C E, Hu G, et al. Parallel and intertwining threads of domestication in allopolyploid cotton. *Adv Sci*, 2021, 8: 2003634
- 3 Niu R Y, Gao Z, Xiong X P, et al. Research and prospects in breeding applications of cotton wild germplasm resources (in Chinese). *Biotechnol Bull*, 2025, 41: 21–32 [牛若宇, 高瞻, 熊显鹏, 等. 棉花野生种质资源的育种应用研究与前景. *生物技术通报*, 2025, 41: 21–32]
- 4 Kun W, Shoupu H, Yuxian Z. Cotton2035: from genomics research to optimized breeding. *Mol Plant*, 2025, 18: 298–312

- 5 Chen Z, Debernardi J M, Dubcovsky J, et al. Recent advances in crop transformation technologies. *Nat Plants*, 2022, 8: 1343–1351
- 6 Xu Z H, Zhang X S, Su Y H, et al. Plant cell totipotency and regeneration (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2019, 49: 1282–1300 [许智宏, 张宪省, 苏英华, 等. 植物细胞全能性和再生. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 1282–1300]
- 7 Duclercq J, Sangwan-Norreel B, Catterou M, et al. *De novo* shoot organogenesis: from art to science. *Trends Plant Sci*, 2011, 16: 597–606
- 8 Jin S, Zhang X, Nie Y, et al. Identification of a novel elite genotype for *in vitro* culture and genetic transformation of cotton. *Biologia Plant*, 2006, 50: 519–524
- 9 Sutradhar M, Mandal N. Reasons and riddance of *Agrobacterium tumefaciens* overgrowth in plant transformation. *Transgenic Res*, 2023, 32: 33–52
- 10 Torti S, Schlesier R, Thümmler A, et al. Transient reprogramming of crop plants for agronomic performance. *Nat Plants*, 2021, 7: 159–171
- 11 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
- 12 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
- 13 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: 616–631
- 14 Anjanappa R B, Gruissem W. Current progress and challenges in crop genetic transformation. *J Plant Physiol*, 2021, 261: 153411
- 15 Finer J J, McMullen M D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. *Plant Cell Rep*, 1990, 8: 586–589
- 16 Rech E L, Vianna G R, Aragão F J L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nat Protoc*, 2008, 3: 410–418
- 17 Zhou G, Weng J, Zeng Y, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods Enzymol*, 1983, 101: 433–481
- 18 Yong J, Zhang R, Bi S, et al. Sheet-like clay nanoparticles deliver RNA into developing pollen to efficiently silence a target gene. *Plant Physiol*, 2021, 187: 886–899
- 19 Law S S Y, Liou G, Nagai Y, et al. Polymer-coated carbon nanotube hybrids with functional peptides for gene delivery into plant mitochondria. *Nat Commun*, 2022, 13: 2417
- 20 Alonso J M, Stepanova A N, Leisse T J, et al. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 2003, 301: 653–657
- 21 Zhu Y, Zhu X, Wen Y, et al. Plant hairy roots: induction, applications, limitations and prospects. *Ind Crops Prod*, 2024, 219: 119104
- 22 Thomson G, Dickinson L, Jacob Y. Genomic consequences associated with *Agrobacterium*-mediated transformation of plants. *Plant J*, 2024, 117: 342–363
- 23 Bélanger J G, Copley T R, Hoyos-Villegas V, et al. A comprehensive review of in planta stable transformation strategies. *Plant Methods*, 2024, 20: 79
- 24 Li J, Wang M, Li Y, et al. Multi-omics analyses reveal epigenomics basis for cotton somatic embryogenesis through successive regeneration acclimation process. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 435–450
- 25 Wang Y F, Diao X M. Advances on QTL location and cloning of genes related to regeneration ability of plant tissue culture (in Chinese). *J Hebei Agric Sci*, 2010, 14: 156–159 [王永芳, 刁现民. 植物再生相关基因的QTL定位及克隆应用研究进展. 河北农业科学, 2010, 14: 156–159]
- 26 Li J, Yuan D, Wang P, et al. Cotton pan-genome retrieves the lost sequences and genes during domestication and selection. *Genome Biol*, 2021, 22: 119
- 27 Srivastava A, Shukla A, Srivastava S, et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of cotton and regeneration via somatic embryogenesis. *Bio Protoc*, 2023, 13: e4677
- 28 Sang Y L, Cheng Z J, Zhang X S. iPSCs: a comparison between animals and plants. *Trends Plant Sci*, 2018, 23: 660–666
- 29 Shi B, Vernoux T. Hormonal control of cell identity and growth in the shoot apical meristem. *Curr Opin Plant Biol*, 2022, 65: 102111
- 30 Gurusaravanan P, Vinoth S, Jayabalan N. An improved agrobacterium-mediated transformation method for cotton (*Gossypium hirsutum* L. ‘KC3’) assisted by microinjection and sonication. *In Vitro Cell Dev Biol: Plant*, 2020, 56: 111–121
- 31 Cui M L, Liu C, Piao C L, et al. A stable *Agrobacterium* rhizogenes-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and plant regeneration from transformed hairy root via embryogenesis. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 604255
- 32 Ge X, Xu J, Yang Z, et al. Efficient genotype-independent cotton genetic transformation and genome editing. *J Integr Plant Biol*, 2023, 65: 907–917

- 33 Wang M, Sun R, Zhang B, et al. Pollen tube pathway-mediated cotton transformation. *Methods Mol Biol*, 2019, 1902: 67–73
- 34 Wang M, Zhang B, Wang Q. Cotton transformation via pollen tube pathway. *Methods Mol Biol*, 2013, 958: 71–77
- 35 Zhao X, Meng Z, Wang Y, et al. Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Nat Plants*, 2017, 3: 956–964
- 36 Li J, Han X L, Shen F F, et al. Studies on improving transformation efficiency via pollen tube pathway in cotton (in Chinese). *Cotton Sci*, 2005, 1: 67–71 [李静, 韩秀兰, 沈法富, 等. 提高棉花花粉管通道技术转化率的研究. *棉花学报*, 2005, 1: 67–71]
- 37 Liu C L, Tian R P, Kong D P, et al. Establishment and application of a large-scale transgenic technology system in cotton (in Chinese). *Chin Agric Sci*, 2014, 47: 4183–4197 [刘传亮, 田瑞平, 孔德培, 等. 棉花规模化转基因技术体系构建及其应用. *中国农业科学*, 2014, 47: 4183–4197]
- 38 Rajasekaran K, Hudspeth R L, Cary J W, et al. High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures. *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 539–545
- 39 Li S, Cong Y, Liu Y, et al. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 246
- 40 Lv Z, Jiang R, Chen J, et al. Nanoparticle-mediated gene transformation strategies for plant genetic engineering. *Plant J*, 2020, 104: 880–891
- 41 Zhang H, Demirer G S, Zhang H, et al. DNA nanostructures coordinate gene silencing in mature plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 7543–7548
- 42 Zhang R, Meng Z, Abid M A, et al. Novel pollen magnetofection system for transformation of cotton plant with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Methods Mol Biol*, 2019, 1902: 47–54
- 43 Demirer G S, Zhang H, Matos J L, et al. High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14: 456–464
- 44 Lowe K, Wu E, Wang N, et al. Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation. *Plant Cell*, 2016, 28: 1998–2015
- 45 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
- 46 Zhang J, Wang F, Zhang C, et al. A novel VIGS method by agroinoculation of cotton seeds and application for elucidating functions of *GhBI-1* in salt-stress response. *Plant Cell Rep*, 2018, 37: 1091–1100
- 47 Shi G, Hao M, Tian B, et al. A methodological advance of tobacco rattle virus-induced gene silencing for functional genomics in plants. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 671091
- 48 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
- 49 Lee H J, Baik J E, Kim K N. Development of an efficient and heritable virus-induced genome editing system in *Solanum lycopersicum*. *Hortic Res*, 2025, 12: uhae364
- 50 Qiao J H, Zang Y, Gao Q, et al. Transgene- and tissue culture-free heritable genome editing using RNA virus-based delivery in wheat. *Nat Plants*, 2025, 11: 1252–1259
- 51 Zhang Y, Dorey S, Swiderski M, et al. Expression of *RPS4* in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 and HSP90. *Plant J*, 2004, 40: 213–224
- 52 Gao X, Britt Jr. R C, Shan L, et al. *Agrobacterium*-mediated virus-induced gene silencing assay in cotton. *J Vis Exp*, 2011, 20: 2938
- 53 Shen Y, Ye T, Li Z, et al. Exploiting viral vectors to deliver genome editing reagents in plants. *aBIOTECH*, 2024, 5: 247–261
- 54 Hwang H H, Yu M, Lai E M. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *Arabidopsis Book*, 2017, 15: e0186
- 55 Zhu X, Xu Z, Wang G, et al. Single-cell resolution analysis reveals the preparation for reprogramming the fate of stem cell niche in cotton lateral meristem. *Genome Biol*, 2023, 24: 194
- 56 Xu Z, Wang G, Zhu X, et al. Genome assembly of two allotetraploid cotton germplasms reveals mechanisms of somatic embryogenesis and enables precise genome editing. *Nat Genet*, 2025, 57: 2028–2039
- 57 Zhang X, Xu G, Cheng C, et al. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Hemp (*Cannabis sativa* L.). *Plant Biotechnol J*, 2021, 19: 1979–1987
- 58 Zhao Y, Cheng P, Liu Y, et al. A highly efficient soybean transformation system using GRF3-GIF1 chimeric protein. *J Integr Plant Biol*, 2025, 67: 3–6
- 59 Li J, Pan W, Zhang S, et al. A rapid and highly efficient sorghum transformation strategy using GRF4-GIF1/ternary vector system. *Plant J*, 2024,

- 117: 1604–1613
- 60 Feng Q, Xiao L, He Y, et al. Highly efficient, genotype-independent transformation and gene editing in watermelon (*Citrullus lanatus*) using a chimeric *CIGRF4-GIF1* gene. *J Integr Plant Biol*, 2021, 63: 2038–2042
- 61 Nahirñak V, Almasia N I, González M N, et al. State of the art of genetic engineering in potato: from the first report to its future potential. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 768233
- 62 Ribeiro T P, Arraes F B M, Lourenço-Tessutti I T, et al. Transgenic cotton expressing Cry10Aa toxin confers high resistance to the cotton boll weevil. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15: 997–1009
- 63 Chen Y, Lange A, Vaghchhipawala Z, et al. Direct germline transformation of cotton meristem explants with no selection. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 575283
- 64 Kellner M J, Koob J G, Gootenberg J S, et al. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc*, 2019, 14: 2986–3012
- 65 Sanghera G S, Gill M S, Gosal S S. Optimization of shoot tip-based *in vitro* plant regeneration in cotton (*Gossypium* spp.). *Int J Plant Dev Biol*, 2010, 4: 26–30
- 66 Ribeiro T P, Lourenço-Tessutti I T, de Melo B P, et al. Improved cotton transformation protocol mediated by *Agrobacterium* and biolistic combined-methods. *Planta*, 2021, 254: 20
- 67 Ahmed H A A, Barpete S, Uranbey S, et al. An efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation using embryonic axis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Russ J Plant Physiol*, 2020, 67: 581–587
- 68 Manghwar H, Lindsey K, Zhang X, et al. CRISPR/Cas system: recent advances and future prospects for genome editing. *Trends Plant Sci*, 2019, 24: 1102–1125
- 69 Urnov F D, Rebar E J, Holmes M C, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 636–646
- 70 Gaj T, Gersbach C A, Barbas Iii C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31: 397–405
- 71 Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823
- 72 Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*, 2011, 45: 273–297
- 73 Xie K, Minkenberg B, Yang Y. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3570–3575
- 74 Wang P, Zhang J, Sun L, et al. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16: 137–150
- 75 Long L, Guo D D, Gao W, et al. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing in cotton by improved sgRNA expression. *Plant Methods*, 2018, 14: 85
- 76 Chen X, Lu X, Shu N, et al. Targeted mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*, 2017, 7: 44304
- 77 Gao W, Long L, Tian X, et al. Genome editing in cotton with the CRISPR/Cas9 system. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1364
- 78 Li B, Fu C, Zhou J, et al. Highly efficient genome editing using geminivirus-based CRISPR/Cas9 system in cotton plant. *Cells*, 2022, 11: 2902
- 79 Li J, Manghwar H, Sun L, et al. Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 858–868
- 80 Wang G, Xu Z, Wang F, et al. Development of an efficient and precise adenine base editor (ABE) with expanded target range in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*). *BMC Biol*, 2022, 20: 45
- 81 Wang G, Wang F, Xu Z, et al. Precise fine-tuning of *GhTFL1* by base editing tools defines ideal cotton plant architecture. *Genome Biol*, 2024, 25: 59
- 82 Qin L, Li J, Wang Q, 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. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 45–56
- 83 Ding X, Yu L, Chen L, et al. Recent progress and future prospect of CRISPR/Cas-derived transcription activation (CRISPRa) system in plants. *Cells*, 2022, 11: 3045
- 84 Yu L, Li Z, Ding X, et al. Developing an efficient CRISPR-dCas9-TV-derived transcriptional activation system to create three novel cotton germplasm materials. *Plant Commun*, 2023, 4: 100600
- 85 Li B, Rui H, Li Y, et al. Robust CRISPR/Cpf1 (Cas12a)-mediated genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant*

[Biotechnol J](#), 2019, 17: 1862–1864

- 86 Li B, Liang S, Alariqi M, et al. The application of temperature sensitivity CRISPR/LbCpfI (LbCas12a) mediated genome editing in allotetraploid cotton (*G. hirsutum*) and creation of nontransgenic, gossypol-free cotton. [Plant Biotechnol J](#), 2021, 19: 221–223
- 87 Hui F, Tang X, Li B, et al. Robust CRISPR/Mb2Cas12a genome editing tools in cotton plants. [iMeta](#), 2024, 3: e209
- 88 Li C, Tuerxun Z, Yang Y, et al. Application of an endogenous pGh α GloA promoter in CRISPR/Cas12a system for efficient genome editing to creat glandless cotton germplasm. [J Integr Agr](#), 2024, doi: 10.1016/j.jia.2024.09.011
- 89 Wang Q, Alariqi M, Wang F, et al. The application of a heat-inducible CRISPR/Cas12b (C2c1) genome editing system in tetraploid cotton (*G. hirsutum*) plants. [Plant Biotechnol J](#), 2020, 18: 2436–2443
- 90 Yu L, Zou J, Hussain A, et al. Systemic evaluation of various CRISPR/Cas13 orthologs for knockdown of targeted transcripts in plants. [Genome Biol](#), 2024, 25: 307
- 91 Yu L, Alariqi M, Li B, et al. CRISPR/dCas13(Rx) derived RNA *N*⁶-methyladenosine (m⁶A) dynamic modification in plant. [Adv Sci](#), 2024, 11: 2401118
- 92 Zhu S, Yu X, Li Y, et al. Highly efficient targeted gene editing in upland cotton using the CRISPR/Cas9 system. [Int J Mol Sci](#), 2018, 19: 3000
- 93 Zhang D, Chen C, Wang H, et al. Cotton fiber development requires the pentatricopeptide repeat protein GhIm for splicing of mitochondrial *nad7* mRNA. [Genetics](#), 2021, 217: 1–7
- 94 Zhao G, Le Y, Sun M, et al. A dominant negative mutation of *GhMYB25-like* alters cotton fiber initiation, reducing lint and fuzz. [Plant Cell](#), 2024, 36: 2759–2777
- 95 Tian Z, Zhang Y, Zhu L, et al. Strigolactones act downstream of gibberellins to regulate fiber cell elongation and cell wall thickness in cotton (*Gossypium hirsutum*). [Plant Cell](#), 2022, 34: 4816–4839
- 96 Li T, Long L, Tang Y, et al. Knock-out of *GhPDCT* with the CRISPR/Cas9 system increases the oleic acid content in cottonseed oil. [J Integr Agr](#), 2024, 23: 3468–3471
- 97 Chen Y, Fu M, Li H, et al. High-oleic acid content, nontransgenic allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) generated by knockout of *GhFAD2* genes with CRISPR/Cas9 system. [Plant Biotechnol J](#), 2021, 19: 424–426
- 98 Lin J L, Fang X, Li J X, et al. Dirigent gene editing of gossypol enantiomers for toxicity-depleted cotton seeds. [Nat Plants](#), 2023, 9: 605–615
- 99 Gao W, Xu F C, Long L, et al. The gland localized *CGPI* controls gland pigmentation and gossypol accumulation in cotton. [Plant Biotechnol J](#), 2020, 18: 1573–1584
- 100 Zhang L, Wang M, Li N, et al. Long noncoding RNAs involve in resistance to *Verticillium dahliae*, a fungal disease in cotton. [Plant Biotechnol J](#), 2018, 16: 1172–1185
- 101 Binyameen B, Khan Z, Khan S H, et al. Using multiplexed CRISPR/Cas9 for suppression of cotton leaf curl virus. [Int J Mol Sci](#), 2021, 22: 12543
- 102 Iqbal Z, Sattar M N, Shafiq M. CRISPR/Cas9: a tool to circumscribe cotton leaf curl disease. [Front Plant Sci](#), 2016, 7: 475
- 103 Ali I, Amin I, Briddon R W, et al. Artificial microRNA-mediated resistance against the monopartite begomovirus *Cotton leaf curl Burewala virus*. [Virol J](#), 2013, 10: 231
- 104 Heigwer F, Zhan T, Breinig M, et al. CRISPR library designer (CLD): software for multispecies design of single guide RNA libraries. [Genome Biol](#), 2016, 17: 55
- 105 Zhang J, Li J, Saeed S, et al. Identification and functional analysis of lncRNA by CRISPR/Cas9 during the cotton response to sap-sucking insect infestation. [Front Plant Sci](#), 2022, 13: 784511
- 106 Sun L, Alariqi M, Wang Y, 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. [Adv Sci](#), 2024, 11: e2306157
- 107 Wang F, Liang S, Wang G, et al. CRISPR-Cas9-mediated construction of a cotton CDPK mutant library for identification of insect-resistance genes. [Plant Commun](#), 2024, 5: 101047
- 108 Wang Q, Yang G, Jia R, et al. Utilizing the mutant library to investigate the functional characterization of *GhGLR3.4* regulating jasmonic acid to defense pest infestation. [Plant J](#), 2024, 120: 2889–2903
- 109 Alariqi M, Ramadan M, Wang Q, et al. Cotton 4-coumarate-CoA ligase 3 enhanced plant resistance to *Verticillium dahliae* by promoting jasmonic acid signaling-mediated vascular lignification and metabolic flux. [Plant J](#), 2023, 115: 190–204
- 110 Wang Y, Zhu C, Chen G, et al. Cotton bollworm (*H. armigera*) effector PPI5 targets FKBP17-2 to inhibit ER immunity and JA/SA responses,

- enhancing insect feeding. *Adv Sci*, 2024, 11: e2407826
- 111 Zhu Q H, Jin S, Yuan Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated saturated mutagenesis of the cotton *MIR482* family for dissecting the functionality of individual members in disease response. *Plant Direct*, 2022, 6: e410
- 112 Liu S, Zhang X, Xiao S, et al. A single-nucleotide mutation in a GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE gene confers resistance to fusarium wilt in *Gossypium hirsutum*. *Adv Sci*, 2021, 8: 2002723
- 113 Li B, Zhang M, Sun W, et al. *N*⁶-methyladenosine RNA modification regulates cotton drought response in a Ca²⁺ and ABA-dependent manner. *Plant Biotechnol J*, 2023, 21: 1270–1285
- 114 Wang Y, Meng Z, Liang C, et al. Increased lateral root formation by CRISPR/Cas9-mediated editing of arginase genes in cotton. *Sci China Life Sci*, 2017, 60: 524–527
- 115 Sun W, Xia L, Deng J, et al. Evolution and subfunctionalization of CIPK6 homologous genes in regulating cotton drought resistance. *Nat Commun*, 2024, 15: 5733
- 116 Wu Y, Li X, Li Y, et al. Degradation of de-esterified pectin/homogalacturonan by the polygalacturonase *GhNSP* is necessary for pollen exine formation and male fertility in cotton. *Plant Biotechnol J*, 2022, 20: 1054–1068
- 117 Zhang R, Zhou L, Li Y, et al. Rapid identification of pollen- and anther-specific genes in response to high-temperature stress based on transcriptome profiling analysis in cotton. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 3378
- 118 Li Y, Ma H, Wu Y, et al. Single-cell transcriptome atlas and regulatory dynamics in developing cotton anthers. *Adv Sci*, 2024, 11: e2304017
- 119 Li Y, Fu Y, Li Y, et al. Reversing anther thermotolerance by manipulating the *cis*-elements in the promoter of a high-temperature upregulated gene *Casein Kinase I* in upland cotton. *Sci China Life Sci*, 2025, 68: 1558–1569
- 120 Long L, Feng Y M, Shang S Z, et al. *In vivo* maternal haploid induction system in cotton. *Plant Physiol*, 2024, 194: 1286–1289
- 121 Deng J, Sun W, Zhang B, et al. GhTCE1-GhTCEE1 dimers regulate transcriptional reprogramming during wound-induced callus formation in cotton. *Plant Cell*, 2022, 34: 4554–4568
- 122 Zhang M, Wei H, Hao P, et al. *GhGPAT12/25* are essential for the formation of anther cuticle and pollen exine in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Front Plant Sci*, 2021, 12: 667739
- 123 Wang C, Liu J, Xie X, et al. *GhAPI-D3* positively regulates flowering time and early maturity with no yield and fiber quality penalties in upland cotton. *J Integr Plant Biol*, 2023, 65: 985–1002
- 124 Han J, Tan J, Tu L, et al. A peptide hormone gene, *GhPSK* promotes fibre elongation and contributes to longer and finer cotton fibre. *Plant Biotechnol J*, 2014, 12: 861–871
- 125 Wang D, Hu X, Ye H, et al. Cell-specific clock-controlled gene expression program regulates rhythmic fiber cell growth in cotton. *Genome Biol*, 2023, 24: 49
- 126 Blenda A, Fang D D, Rami J F, et al. A high density consensus genetic map of tetraploid cotton that integrates multiple component maps through molecular marker redundancy check. *PLoS One*, 2012, 7: e45739
- 127 Han J, Lopez-Arredondo D, Yu G, et al. Genome-wide chromatin accessibility analysis unveils open chromatin convergent evolution during polyploidization in cotton. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2209743119
- 128 Peng R, Xu Y, Tian S, et al. Evolutionary divergence of duplicated genomes in newly described allotetraploid cottons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119: e2208496119
- 129 Manghwar H, Li B, Ding X, et al. CRISPR/Cas systems in genome editing: methodologies and tools for sgRNA design, off-target evaluation, and strategies to mitigate off-target effects. *Adv Sci*, 2020, 7: 1902312

Genetic transformation and gene editing in cotton: advances and prospects

YU Lu, YI YuZhen, ZHANG XianLong & JIN ShuangXia*

*College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Hubei Hongshan Laboratory,
National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Wuhan 430070, China*

* Corresponding author; E-mail: jsx@mail.hzau.edu.cn

Cotton (*Gossypium* spp.) is a vital global crop, and its genetic improvement is crucial for enhancing fiber quality, stress resistance, and yield. As the predominant cultivated species, upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) possesses a complex allotetraploid (AADD) genome and highly redundant genes, which have severely constrained conventional gene functional studies and breeding efficiency. Recent advances in high-quality genome sequencing, breakthroughs in genetic transformation, and innovations in gene-editing tools have created unprecedented opportunities for cotton functional genomics and precision molecular breeding. This review systematically summarizes the latest progress: (i) to address the genotype-dependent bottleneck in genetic transformation, we discuss high-efficiency recipient materials (e.g., Jin668) and sequential regeneration acclimation strategies. (ii) We focus on multi-dimensional gene-editing systems including CRISPR-Cas9/12/13 nucleases, base editors, and epigenetic editors, which were largely developed in China, and elucidate their applications in precise gene knockout and expression regulation, alongside the establishment of a genome-wide off-target assessment system. (iii) These technologies have enabled the construction of a systematic mutant library covering over 5000 genes governing multidimensional traits including fiber quality, biotic/abiotic stress resistance, and seed improvement. Founded on standardized heritable materials and open-access platforms, this resource is a key asset for gene functional analysis and breeding innovation. (iv) We present an in-depth analysis of major technical challenges, including transformation efficiency limitations, off-target risks, polyploid editing complexity, and regeneration barriers. (v) Finally, we outline future directions, including developing novel delivery systems, more precise editing tools, and targeted strategies for complex trait regulatory networks, as well as pathways toward the commercialization of gene-edited cotton varieties. This review will serve as a systematic theoretical reference and a practical guide for innovating cotton biotechnology and developing breakthrough breeding varieties.

upland cotton, genetic transformation, CRISPR/Cas system, gene delivery, breeding improvement

doi: [10.1360/SSV-2025-0249](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0249)