

貳壹 生物技術與安全評估

一 精準農業生物技術平台之建置與遺傳性狀先期調查試驗

(一) 基因編輯矮化及耐逆境功能的水稻編輯系之遺傳性狀先期調查試驗

曾清山

本研究利用CRISPR/Cas9基因編輯技術針對水稻產量、抗蟲、抗病及香味等相關基因進行品種的開發及應用。本試驗實施地點為本所之基因轉殖植物田間試驗隔離園區，所有田間管理試驗依據「農業試驗所基因轉殖植物田間試驗作業管理規範」之規定執行。基因編輯性狀包括穗密度 (CRP-DEP1)、每穗粒數 (CRP-Gn1a)、穀粒大小 (CRPqTGW3)、穀粒重(CRP-qTGW3)、植株矮化 (CRP-GA20ox、OE-Pa376)、抗稻熱病 (CRPNbs2)、抗褐飛蝨 (CRP-CYP71A1a、CRP-GNS5)、米粒香味 (CRP-badh2) 等。第一期作和第二期作分別有238個、134個基因編輯系進行田間隔離栽培、性狀調查及繁殖，每一基因編輯系皆進行遺傳性狀調查 (圖21-1) 與單株拍照。初步調查結果顯示，植株矮化調控基因*GA2ox1*、 *GA2ox2*的CRISPR knock out mutant，以及兩者皆編輯的double knock out mutant，從株高之平均調查結果上，可初步看到當mutant之*GA2ox*疊加後，植株高度之改變程度提升，顯示兩者在調控株高上有互補關係。

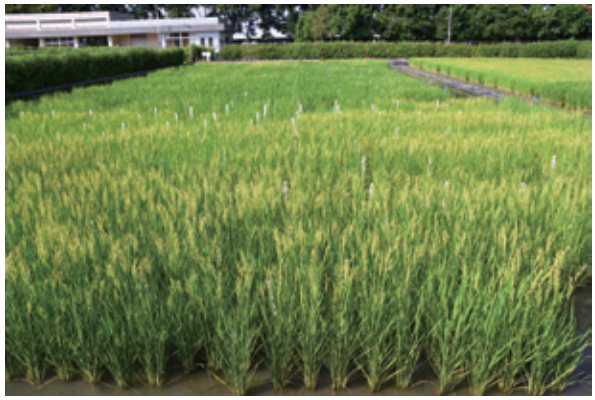


圖21-1. 基因編輯矮化及耐逆境功能的水稻編輯系之目標性狀評估

(二) 建立水稻精準基因編輯平台

王怡雯、游舜期、林大鈞

利用CRISPR/Cas9精準編輯水稻*sbe3*基因產生SNP或INDEL的突變位點，並透過自交重組取得8個無外源載體片段的同質結合編輯系，接續分析T_2與T_3基因編輯系之種子抗性澱粉含量為17.6%-28.68%，明顯高於TNG67對照組含量 (約0.42%)，約為其42-68倍。於種子外觀上，發現*sbe3*基因編輯系的種子略小於TNG67，特別是粒長、粒寬、面積等皆有顯著差異 (圖21-2)，同時亦觀察到其有白堊質 (chalky kernels)，推測肇因於種子發育過程中發生不正常直鏈澱粉堆疊所致。在農藝性狀方面，*sbe3*基因編輯系的千粒重及穗重與TNG67呈現顯著差異。綜合上述結果，本研究確實已取得具非基改潛力與同質之高抗性澱粉*sbe3*基因編輯系 (圖21-3)，未來擬針對其基因編輯所產生的突變位點，設計功能性分子標誌，以應用於後續導入IR64品種，做為前景篩選之基礎。

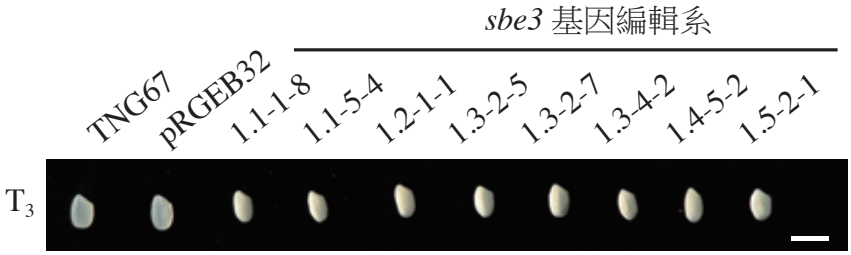


圖21-2. *sbe3* T_3基因編輯系之穀粒外觀。Bar=0.5 cm

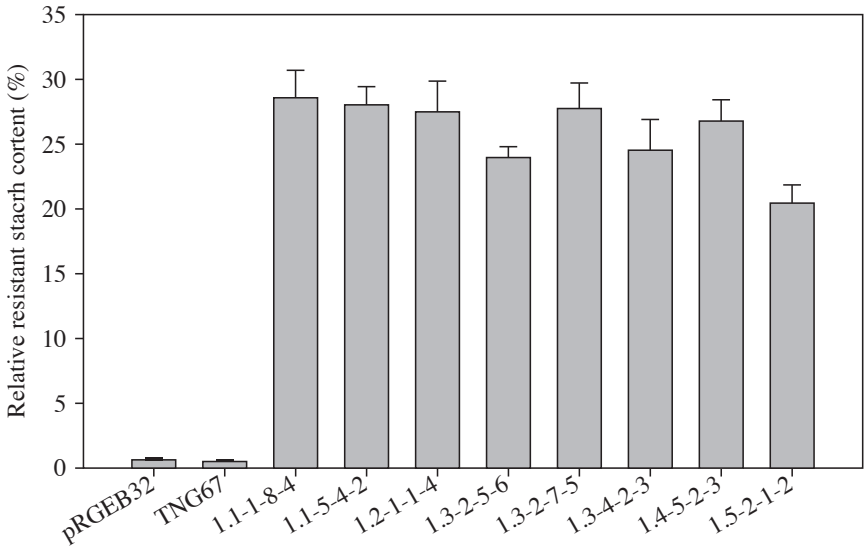


圖21-3. *sbe3* T_3基因編輯系之抗性澱粉含量

二 開發自動化或高通量環境安全風險評估技術

陳涵葳

隨著次世代定序的普及與環境微生物基因體學的發展，擴增子序列變體 (amplicon sequence variant; ASV) 以分裂分配演算法 (divisive partitioning algorithm) 進行讀序分析，結合讀序豐度校正錯誤率，可有效降低偽陽性誤判。DADA2適用於Illumina定序平台，能產生極高分辨率的ASVs資料，適合進行菌種層級物種分類指派。110年利用土塊、旱田與水田之土壤微生物定序資料，完成DADA2套件物種分類指派策略的研究，結果顯示，DADA2套件內件之assignTaxonomy指令搭配包含菌種名的參考序列訓練集，有最佳的物種分類指派效能。以二元分類法評估SILVA138、SILVA138.1、GTDB與RefSeq+RDP參考序列訓練集之選擇，對土壤微生物物種分類指派效能影響，GTDB訓練集敏感度最高，SILVA138與SILVA138.1訓練集具有最佳特異性，而RefSeq+RDP訓練集物種分類指派結果之正確率、正確覆蓋率、馬修斯相關係數、陽性預測率指標均高於其他訓練集 (圖21-4)。隨著16S rRNA基因參考序列資料庫不斷地更新，進行高解析的ASVs資料集分析時，更應該謹慎選擇反覆評估，才能更準確地描述環境與微生物多樣性間的關係。

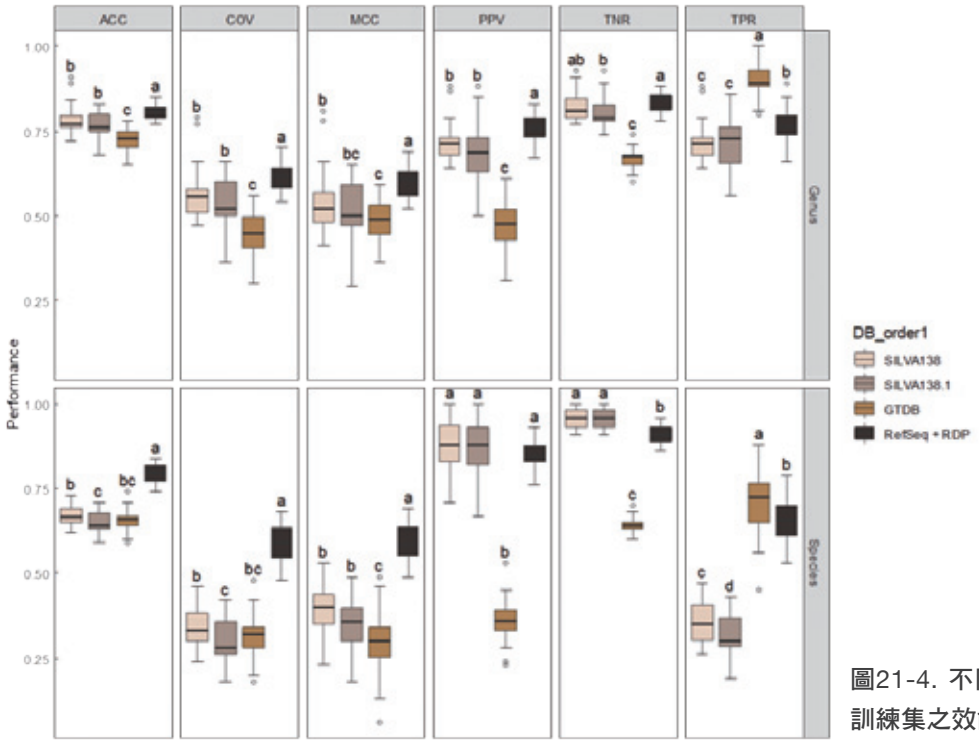


圖21-4. 不同參考序列訓練集之效能指標評估