貳、基因編輯研究

一、重要作物基因編輯平台之建立與應用

王怡雯、游舜期、曾清山

(一) 利用基因編輯平台探勘水稻 *sbe3*基因功能之研究

*sbe3*是影響抗性澱粉合成的關鍵基因，本研究利用CRISPR/Cas9技術編輯探討水稻澱粉分支酶 (starch branching enzyme, *SBE3*, LOC_Os02g32660) 功能。109年將所獲得之6株擬轉殖系，以PCR分析其基因型，皆為*sbe3*基因刪減表現系統導入的T_0轉殖系。經自交取得T_1子代，接著序列分析結果發現其發生插入、刪減及SNP等基因編輯情形 (圖22-1)。經自交取得T_2種子後，進行抗性澱粉的含量分析，結果發現*sbe3*擬轉殖系的抗

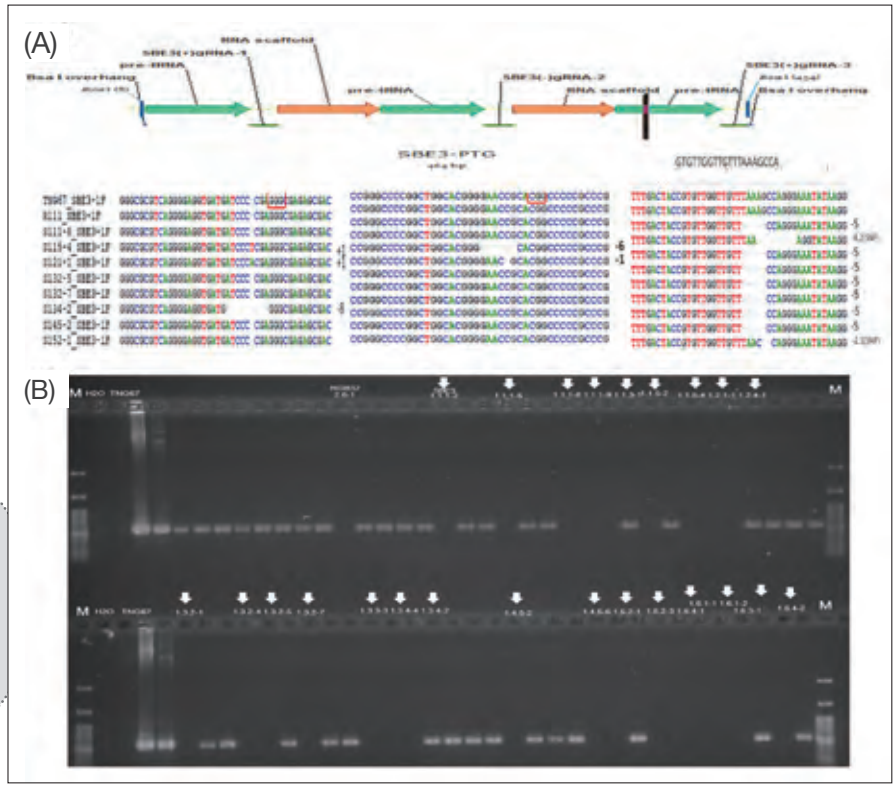


圖22-1. *sbe3*轉殖系之分子檢測。(A) *sbe3*轉殖系之目標編輯位點編輯情形；(B) *sbe3* T_1轉殖系PCR基因型分析結果

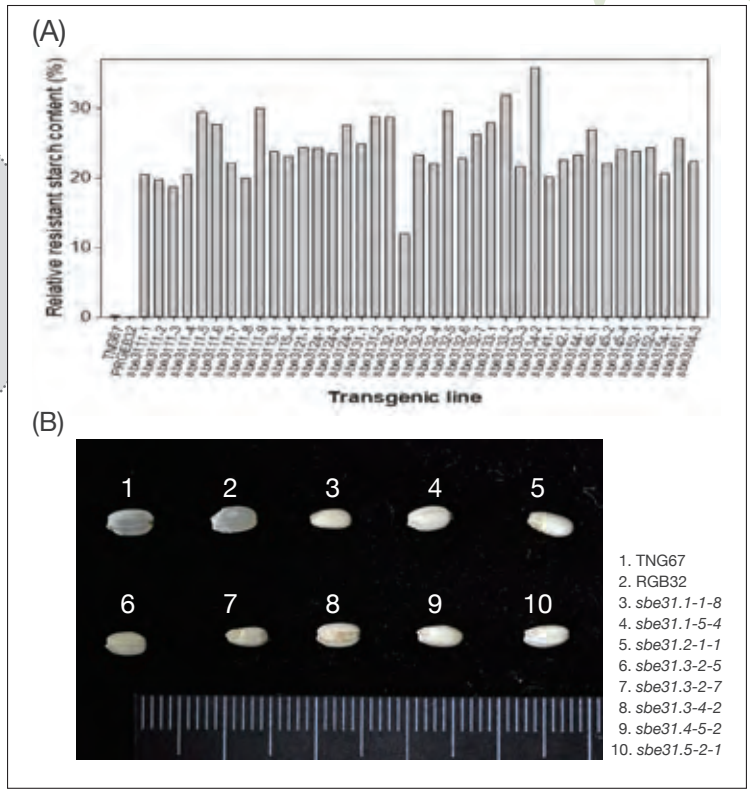


圖22-2. *sbe3*轉殖系之抗性澱粉含量分析與種子外觀觀察。(A) *sbe3*轉殖系T_2種子抗性澱粉濃度分析結果；(B) *sbe3* T_2轉殖系所篩選出同質結合體之種子外觀

性澱粉含量約為19%-35%，明顯高於TNG67對照組含量約0.25% (圖22-2)。這些材料可進一步用來探討*sbe3*對偶基因型 (allelic patterns) 在抗性澱粉生合成機制中所扮演的角色。

(二) 利用番茄原生質體評估基因編輯平台應用之可行性

本研究延續本所前期番茄核心收集計畫執行結果，先針對番茄廣幅型感病基因 (*downy mildew resistance 6, DMR6*) 進行基因編輯平台之應用進行評估。先期評估需建立番茄原生質體分離及短暫性轉殖法，主要利用特定酵素處理番茄葉片後，取得完整之原生質體 (圖22-3及圖22-4)，再經由PEG轉殖法導入螢光基因 (圖22-5) 及基因組編輯技術 (CRISPR/Cas9系統)，以評估現有生物技術平台進行基因編輯精準育種平台之可行性，並冀可供後續大型及跨域合作計畫研提之用。

(三) 基因編輯水稻品種開發及應用

本研究利用基因編輯技術，進行目標基因功能分析。試驗地點為本所之基因轉殖植物田間試驗隔離園區 (24°01'N, 120°41'E)，並依據本所「基因轉殖植物田間試驗作業管理規範」執行。試驗材料為水稻台農67號和台農71號。基因編輯的性狀包括穗密度 (CRP-*DEP1*)、每穗粒數 (CRP-*Gn1a*)、穀粒大小重量(CRP-*qTGW3*)、植株高度 (CRP-*GA20ox2*)、抗稻熱病(OE-SA0169、CRP-*Nbs2*)、抗褐飛蝨(CRP-CYP71A1a、CRP-TDC2、CRP-GNS5)、米粒香味 (CRP-*badh2.7*) 等。總計完成114個水稻基因編輯品系田間隔離栽培、性狀調查及繁殖 (圖22-6)。預計於110年進行各品系遺傳特性調查與目標性狀評估。

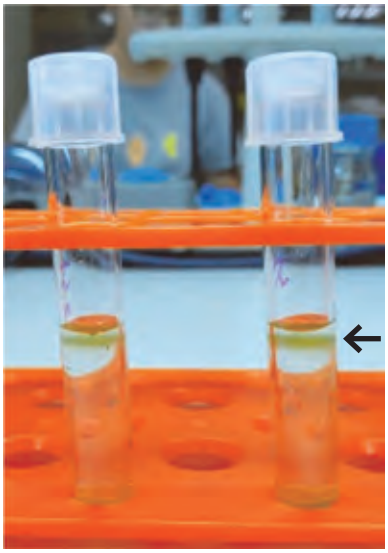


圖22-3. 番茄葉片於特定酵素處理下，所獲得之原生質體

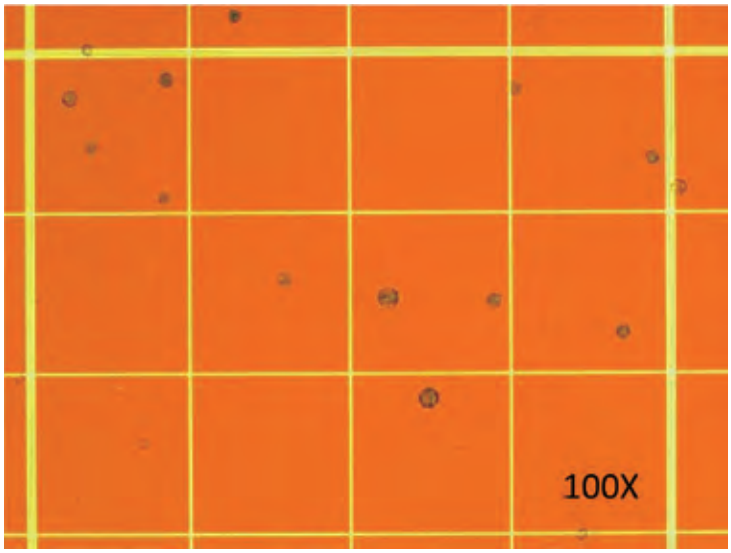


圖22-4. 於正立式顯微鏡下以血球計數器計算原生質體數量

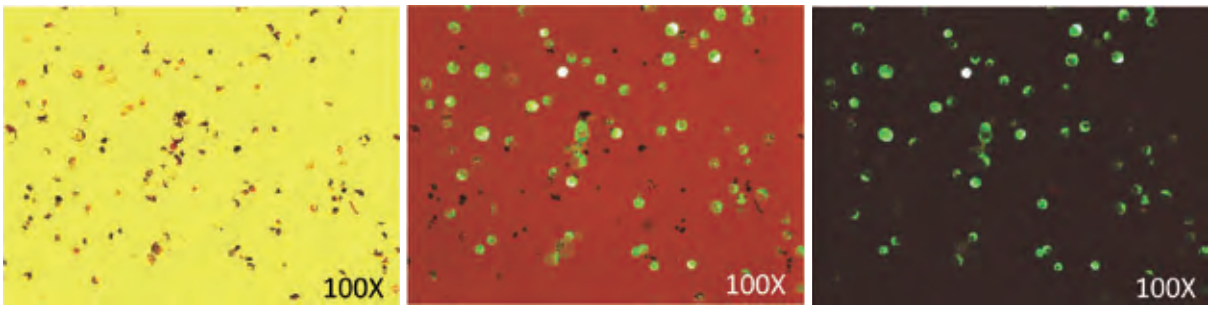


圖22-5. 以pUC-35S-ZsGFP作為轉殖載體，觀測螢光基因在番茄原生質體表現情形。明視野 (左)、明視野+螢光視野 (中)、螢光視野 (右)

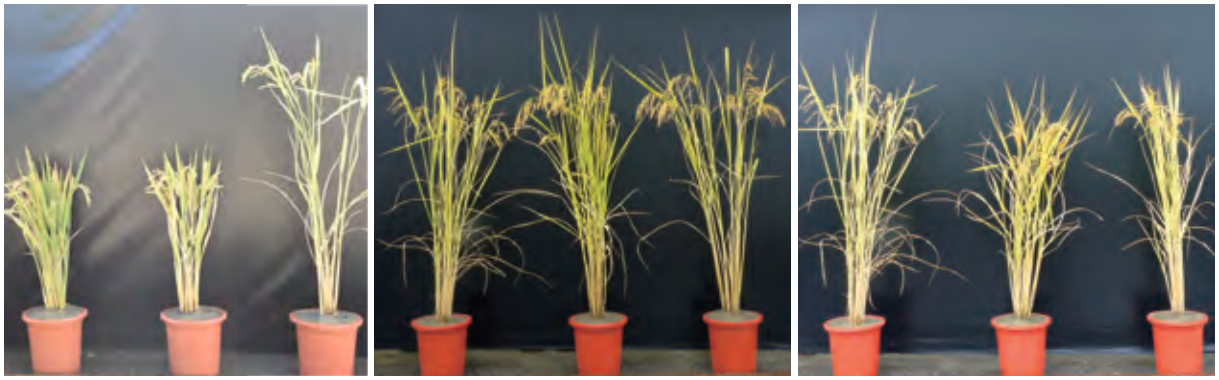


圖22-6. 基因編輯水稻*GA20ox2*、*Gn1a*和*DEP1*編輯系植株性狀