台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 72(3):181–196 (2023)
DOI:10.6156/JTAR.202309_72(3).0001

專題論述

多重基因編輯於作物精準育種之應用

王怡雯[1,**] 陳涵葳[2,**] 游舜期[2] 王昭月[2] 林大鈞[3,*]

摘要

王怡雯、陳涵葳、游舜期、王昭月、林大鈞。2023。多重基因編輯於作物精準育種之應用。台灣農業研究 72(3):181–196。

多重基因編輯是新興精準育種的高效率工具之一，由於可以同時編輯基因組中 2 個或多個不同的 DNA 位點，故適用於數量性狀基因或同源基因家族所調控重要性狀之探勘。操作多重基因編輯的系統可概略分成 ZFNs、TALENs 及 CRISPR/Cas 三種系統，其中以 CRISPR/Cas 操作較為簡單、編輯效率較高以及具有成本較低的優勢，因此成為目前主流。本篇主要介紹以 CRISPR/Cas 為基礎，進而發展出的多重基因編輯系統。文中另將針對編輯目的、載體構築表現系統、多 gRNA 表現方式，以及在水稻、小麥、玉米、油菜、番茄及馬鈴薯等糧食與經濟作物的成功實例加以說明，冀能作為研究人員進行相關研究之參考依據。

關鍵詞：多重基因編輯、精準育種、數量性狀基因、同源基因。

前言

當前全球人口數約為 80 億，預估 2050 年可能成長至 97 億，糧食生產需提升 70–85% 才能供應所需 (Zafar *et al*. 2020)。然而近年因為氣候變遷頻繁發生，農業生產地區受到暴雨或乾旱的肆虐，造成糧食產量下降、供應緊縮及產品價格波動劇烈等問題；歐盟執委會於 2021 年發表新興基因技術 (new genomic techniques) 研究報告，認為基因編輯技術有助達成糧食永續生產的目標 (Zimny 2022)。基因編輯技術可針對特定序列進行敲除 (knockout)、敲入 (knock-in)、替換 (replacement) 或定點突變 (point mutation)，實現精準育種 (precision breeding) 的目標，如 Lusser 等學者的定義，屬於新興植物育種技術 (new plant breeding techniques; NPBT) (Lusser *et al*. 2011; Enfissi *et al*. 2021)。常用的基因編輯工具包括 zinc finger nucleases (ZFNs)、transcription activator-like effector nucleases (TALENs)，以及 clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas)，簡稱 CRISPR/Cas 等。ZFNs 與 TALENs 是基於蛋白質的核酸酶系統 (protein-based nuclease system)，分為 2 個結構域 (domain)，ZF 結構域或 TALE 結構域負責與目標核酸序列辨識結合，再由核酸酶結構域負責切割，ZFNs 或 TALENs 不論在設計、操作彈性、編輯效率、專一性及成本上皆不如 CRISPR/Cas 系統簡單有效 (Ho *et al*. 2018)。CRISPR/Cas 系統是基於核糖核酸與蛋白質的系統 (RNA-protein based system)，引導 RNA (guide RNA; gRNA) 負責辨識目標序列，Cas9 核酸酶負責切割，gRNA 分成 CRISPR RNA (crRNA) 與 trans-activating crRNA (tracrRNA) 2 個部分，其中 crRNA 是 1 段與目標序列互補的 17–20 nt 序列，tracrRNA 主要功能是修飾 pre-crRNA 形成具功能之成熟 crRNA，並與 Cas9 核酸酶形成複合體，為了方便操作，利用人工合成的

投稿日期：2023 年 1 月 6 日；接受日期：2023 年 5 月 7 日。
* 通訊作者：dagin@tari.gov.tw
** 王怡雯與陳涵葳並列第一作者。
[1] 農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農業部農業試驗所遺傳資源及生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

方式將 crRNA 與 tracrRNA 合併，成為 single gRNA (sgRNA)，即可引導 Cas9 核酸酶進行編輯，由於 sgRNA 設計簡便定位精準，使得 CRISPR/Cas 系統具有高效率低成本的優勢 (Cao *et al*. 2016)。此外，與 ZFNs 或 TALENs 相比，CRISPR/Cas 系統可表現單一 Cas 核酸酶與多種 sgRNA，同時進行多個序列位置的編輯 (Chen *et al*. 2019)，進而使 CRISPR/Cas 技術不再侷限於單一引導位點 (mono-guide) 而可針對多個位點，進行多基因編輯策略 (multiplexed CRISPR strategies)，故此技術已逐漸成為數量基因功能探勘與精準育種應用的顯學 (McCarty *et al*. 2020)。通常，作物的重要性狀，如生物或非生物逆境抗性、產量及品質等，多為數量性狀。而多重基因編輯的優勢在於「同時」編輯多個目標基因，實現前揭重要作物數量性狀的表現。因此，本文將就多重基因編輯之目的、多重基因編輯之策略及其在育種上之應用進行介紹，冀能作為研究人員進行相關研究之參考依據。

多重基因編輯之目的

多重基因編輯的優勢在於同時編輯多個基因標的，而可應用於下列 3 大主軸：

合成生物學 (synthetic biology)

合成生物學是結合生理學與工業生產原理，以人為方式改變多個目標基因之表現，包括過量表現、降低表現及敲除等，進而調控內生代謝迴路。目前 CRISPR/Cas 系統可搭配蛋白質融合技術，在核酸酶功能缺陷的 Cas 蛋白質上結合蛋白質活化結構域 (activation domain) 或蛋白質抑制結構域 (repression domain)，產生多種功能的 CRISPR，如 CRISPRa 具有轉錄活化功能、CRISPRi 具有轉錄抑制功能。Lian *et al*. (2017) 在酵母菌中測試 dSpCas9、dSaCas9、dSt1Cas9 及 dLbCpf1 等缺陷型 Cas 蛋白質，與不同功能之蛋白質結構域結合之效果，開發 CRISPR-AID 系統。該系統包含 dLbCpf1-VP、dSpCas9-RD1152 及 SaCas9 三種功能型核酸酶模組，可分別對目標基因進行轉錄活化、轉錄干擾及基因功能刪除。如已知酵母菌可利用甲羥戊酸途徑 (mevalonate pathway) 產生 β-胡蘿蔔素，其中 HMG1 是羥甲基戊二酸單醯輔酶 A 還原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase)、EGR9 可催化焦磷酸金合歡酯 (farnesyl pyrophosphate; FPP) 合成角鯊烯 (squalene)，另有 ROX1 轉錄因子抑制多種甲羥戊酸途徑酵素表現，應用 CRISPR-AID 系統強化酵母菌 β-胡蘿蔔素生合成代謝工程，同時提升菌株之 *HMG1* 基因表現、抑制 *ERG9* 基因表現，並刪除 *ROX1* 基因功能，胡蘿蔔素生合成量可增加 2.8 倍 (Lian *et al*. 2017)。

數量性狀之研究

在農業生產中，產量、品質、抗性及抗旱等重要性狀主要由數量性狀基因座 (quantitative trait loci; QTL) 所控制。這些數量性狀多由多個基因所調控，每個基因對性狀均有一定影響程度，這些控制性狀之基因稱為多基因 (polygenes)。由於每個 QTL 在相互作用時，對外表型貢獻較小。因此，利用傳統育種需經多個世代進行 QTLs 的堆疊，且過程中常須進行大量後裔族群選拔的工作，方有機會挑選出具有目標性狀且排除遺傳累贅的個體 (Gao 2021)。利用多重基因編輯技術，可快速有效解決數量性狀之育種。

基因家族之研究

透過全基因組重複 (whole genome duplication; WGD) 與單基因重複 (single-gene duplication; SGD) 等方式，將基因移動或複製到新的位置，造成植物基因組在大小、組成及複雜性方面展現極大的多樣性 (Qiao *et al*. 2019)。基因家族是一群具有相似結構特性與生化功能的蛋白質，具有共同的起源，物種經過 WGD、SGD 或串聯重複 (tandem duplication)、近端重複 (proximal duplication)、轉位子重複 (transposed duplication) 及分散重複 (dispersed duplication) 等方式，而植物對環境的適應使得這些基因在不同物種間有顯著的差異，包括新功能的分化與功能冗餘 (redundancy)，有助對抗環境變化 (Fang *et al*. 2022)。由於基因家族具有序列保守性，利用 CRISPR/Cas 系統可同時編輯多個基因家族成員，

針對重要植物基因家族進行系統性的功能性研究。

多重基因編輯之策略

多重基因編輯載體構築

雙元件轉錄單位 (two-component transcriptional unit; TCTU) 系統

雙元件轉錄單位系統是將 Cas 核酸酶與 gRNAs 分開表現的一種載體構築系統 (圖 1A)，前者可由第二型 RNA 聚合酶啟動子 (RNA polymerase II, Pol II) 驅動，但小片段 gRNA(s) 則可選擇 Pol II 啟動子或第三型 RNA 聚合酶 (Pol III) 啟動子驅動 (Lowder *et al*. 2016)。依照啟動子種類的組合，TCTU 系統又可再分成 Pol II 與 Pol III 混合雙元啟動子 (mixed dual promoter)，或 Pol II 雙元啟動子 2 種型式 (Ren *et al*. 2019)。Pol III 啟動子的優點包括通泛性 (ubiquitously) 與持續性 (constitutively)，適合小片段 RNA 表現，但其缺點則是無法進行表現時期與表現位置的調控。如進行多重基因編輯時，載體中若需要放入多個 Pol III 啟動子，而且在非模式植物系統，不同物種來源的 Pol III 表現量可能不如預期 (Tang *et al*. 2016)。此外，重複使用相同啟動子容易造成基因默化現象 (Belele *et al*. 2013)，或影響轉殖基因的穩定性 (Peremarti *et al*. 2010)。而 Cas 核酸酶與 gRNA 無選擇性的過度表現，也會提高脫靶效應的發生率，導致目標基因的編輯效率降低 (Mikami *et al*. 2015) (表 1)。

單元件轉錄單位 (single transcriptional unit; STU) 系統

單元件轉錄單位系統之特點是由單一啟動子同時驅動 Cas 核酸酶與 gRNA(s) 的表現 (圖 1B)，可減少 CRISPR/Cas 基因編輯載體過大的限制，同時可使用各種誘導型的 Pol II 啟動子，便於特定部位或特定時期進行誘導型的編輯，並可分別在水稻與動物細胞中順利進行多基因編輯 (Yoshioka *et al*. 2016; Ding *et al*. 2018; Xu *et al*. 2019)。簡化單元件轉錄單位 (simplified STU; SSTU) 系統，則是應用 Cpf1 之 pre-crRNA 截切原理設計，減少載體構築時 gRNA(s) 的截切元件，與 TCTU 相比更容易構築，且可利用病毒載體進行轉殖 (Wang *et al*. 2018)。不過，由於 STU 與 SSTU 的構築策略，使轉錄單位相當緊湊靠近，這樣緊湊的結構有可能影響個別轉錄單位的表現量。此外，STU 與 SSTU 系統的設計為 1 個 Cas 核

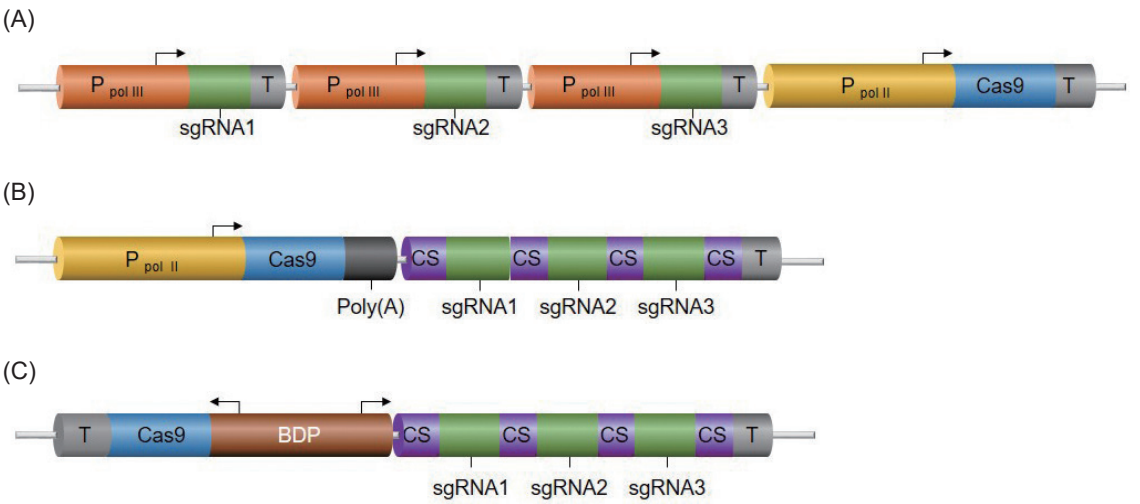


圖 1. 多重基因編輯載體構築。(A) 雙元件轉錄單位系統；(B) 單元件轉錄單位系統；(C) 雙向啟動子表現系統。

Fig. 1. Vector construction of multiple gene edition. (A) Two-component transcriptional unit (TCTU); (B) sigle transcriptional unit (STU); and (C) bidirectional promoter (BDP). Pol III promoter: RNA polymerase III promoter; Pol II promoter: RNA polymerase II promoter; CS: cleavage site; T: terminator; PolyA: poly A tail (McCarty *et al*. 2020).

表 1. 多重基因編輯策略之比較。

Table 1. Comparisions of multiple gene editing strategy.

System[z]	Advantages	Disadvantages	Editing efficiency	References
TCTU	-common system	-gene silencing -poor efficiency -High off-target	low	Belele *et al*. (2013); Peremarti *et al*. (2010); Mikami *et al*. (2015)
STU	-common system -conditional -simple -highly active system	-Unequal distribution of Cas and gRNA(s) expression -poor efficiency	low	Ren *et al*. (2019); Peremarti *et al*. (2010)
BDP	-equal expression of the two genes -avoid gene silencing	further evaluated	high	Ren *et al*. (2019)

[z] TCTU: two-component transcriptional unit; STU: single transcriptional unit; BDP: bidirectional promoter.

酸酶搭配 1 個以上的 gRNA(s)，可能無法實現 Cas 核酸酶與 gRNA(s) 等比例的表達，從而導致標的基因的編輯效率不佳 (Ren *et al*. 2019) (表 1)。

雙向啟動子表現系統 (bidirectional promoter; BDP)

近年來發展的 BDP 系統，是利用單一啟動子同時驅動 Cas 核酸酶與 gRNA(s) 的表現 (圖 1C)，但 Cas 核酸酶與 gRNA(s) 兩者序列為反向 (reverse direction)，與 STU 系統不同的地方在於 Cas 核酸酶與 gRNA(s) 可具有各自獨立的 3′UTR 或終結子 (terminator)，故可具有更好的表現量，進而提供微調的可能性，並維持載體的緊湊性 (Ren *et al*. 2019)。植物天然 BDP (nature BDP; nBDPs) 最早是從玉米的葉綠體染色體中被發現 (Schwarz *et al*. 1981)，隨著基因組定序技術與生物資訊學的發展，植物 BDP 的探勘與研發日益重要。在阿拉伯芥 (Bondino & Valle 2009)、甜瓜 (Wang *et al*. 2008)、辣椒 (Shin *et al*. 2003) 及水稻 (Dhadi *et al*. 2013) 基因組中，皆存在穩定表現的 BDP 系統。Ren *et al*. (2019) 比較水稻內生 BDP 與人工合成 BDP 之基因編輯效率，結果顯示利用基因工程反向表現 2 個 35S 核心啟動子所驅動組合之編輯效率約 10–20%，但前揭 2 個 35S 核心啟動子若再加上增強子 (enhancer) 後，編輯效率可提升至 52%，另使用水稻內生 *OsBiP1* 啟動子驅動之基因編輯效率則可達 86%。

多重 gRNA 表現方式

體內 (*in vivo*) 多重 gRNA 表現載體，可粗略分成 3 種結構 (genetic architectures)：獨立表現卡匣型式、原生 CRISPR-Cas 表現系統之 pre-crRNA 截切，以及轉錄後截切 (post-transcriptionally process) (McCarty *et al*. 2020)。也可利用體外轉錄 (*in vitro* transcription; IVT) 的方式，合成多種小片段 gRNA，再與 Cas 蛋白質組合成核糖蛋白質 (ribonucleoprotein; RNP) 後送入植物細胞，這種無 DNA 片段 (DNA-free) 導入的基因編輯模式，已成功應用的作物包括阿拉伯芥、菸草、萵苣及水稻 (Woo *et al*. 2015)；矮牽牛 (Subburaj *et al*. 2016)；小麥 (Liang *et al*. 2017)；玉米 (Svitashev *et al*. 2016)；大豆 (Kim *et al*. 2017) 以及蘋果 (Malnoy *et al*. 2016)，是目前被認定為極具非基因改造潛力的基因編輯技術。接下來將詳述 6 種 *in vivo* 多重 gRNA 表現之方式。

獨立表現卡匣 (individual expression cassettes)

傳統最常見的表現方式，每個 gRNA 都有各自獨立的啟動子與終結子 (圖 2A)。由於 gRNA 屬於小片段 RNA，一般選擇 Pol III 啟動子 (*U3* 或 *U6* 啟動子)。但載體上重複出現的啟動子序列容易造成啟動子干擾現象 (promoter cross talk effect)，降低整體 gRNA 表現量，或使 gRNA(s) 間表現差異大，重複序列也常發生異源基因的默化現象 (Belele *et al*. 2013)。此外，獨立表現卡匣也限制了載體的選擇。一般而言，農桿菌轉殖載體與病毒載體

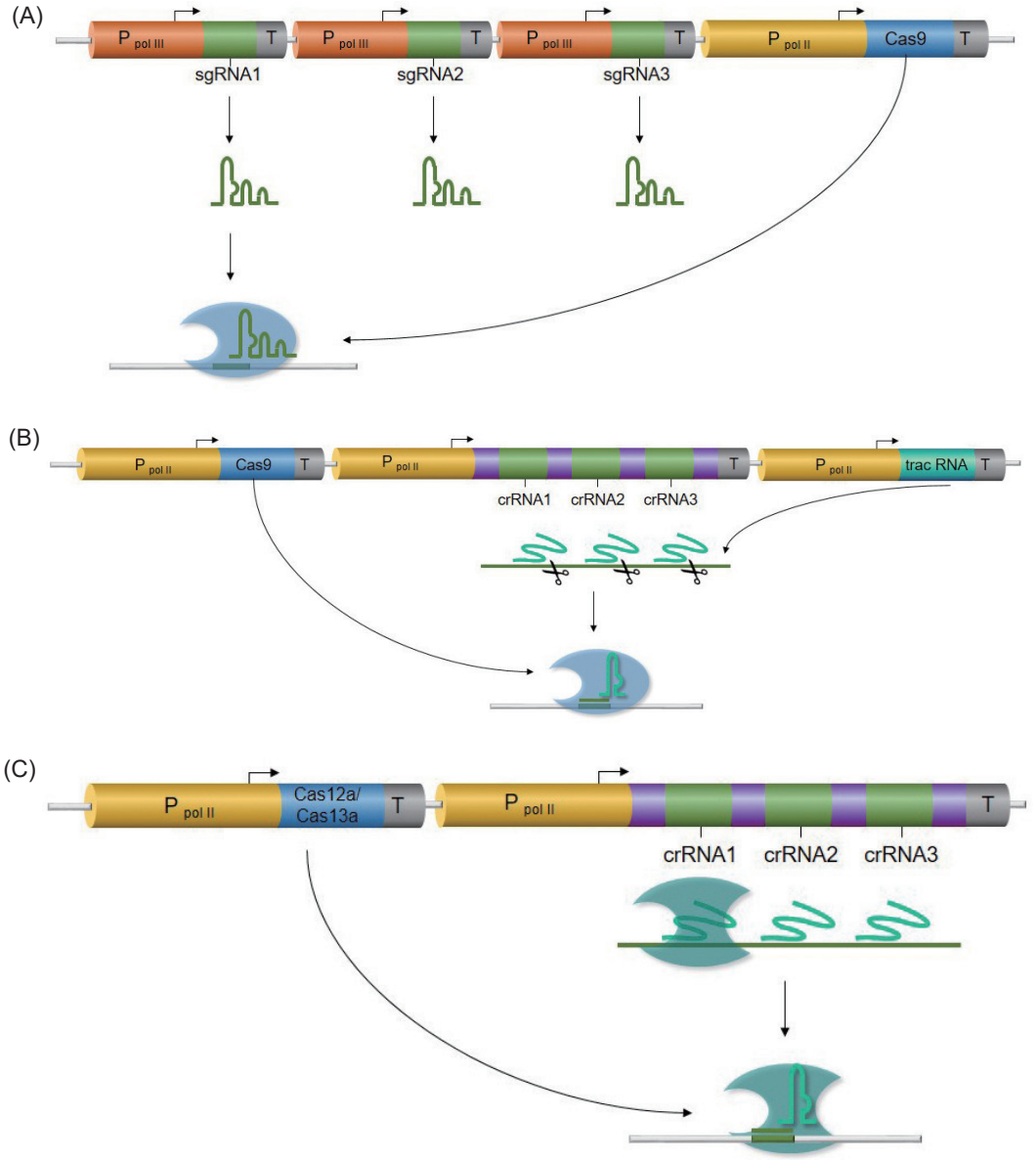


圖 2. 多重 gRNA 表現方式。(A) 獨立表現卡匣：每個 gRNA 有獨立的啟動子與終止子；(B) tracerRNA/RNase III 截切：crRNA 與 tracRNA 結合後，啟動 RNaseIII 進行截切；(C) Cas 12a/Cas 13a/CpfI 截切：不需要 tracrRNA 與 RNase III 即可進行截切；(D) Ribozyme self-cleavage：於 gRNA 的上、下游加上 HH 與 HDV 序列，轉錄產物即可進行自我截切；(E) Csy4 processing：於 gRNA 上游設計 Csy4 辨識序列即可進行截切；(F) tRNA cleaved by RNase：tRNA 初級轉錄產物端點，可被真核生物內生性的 RNase P 與 RNase Z，或細菌中的 RNase E 截切。┌► 表示啟動子。

Fig. 2. Multiplexed gRNA expression approach (McCarty *et al*. 2020). (A) Individual expression cassettes: Each gRNA consists of independent promoter and terminators; (B) tracerRNA/RNase III processing: After the cRNA binds to the tracer RNA, RNase III is activated for truncation; (C) Cas 12a/Cas 13a/CpfI processing: Truncation can be performed without tracrRNA and RNase III; (D) Ribozyme self-cleavage: Self-truncation can be performed by adding HH and HDV sequences upstream and downstream of the gRNA; (E) Csy4 processing: The Csy4 recognition sequence can be designed upstream of the gRNA to truncate; and (F) tRNA cleaved by RNase: The tRNA may be truncated by endogenous RNase P and RNase Z in eucaryotes, or by RNase E in bacteria. ┌► presented the promoters.

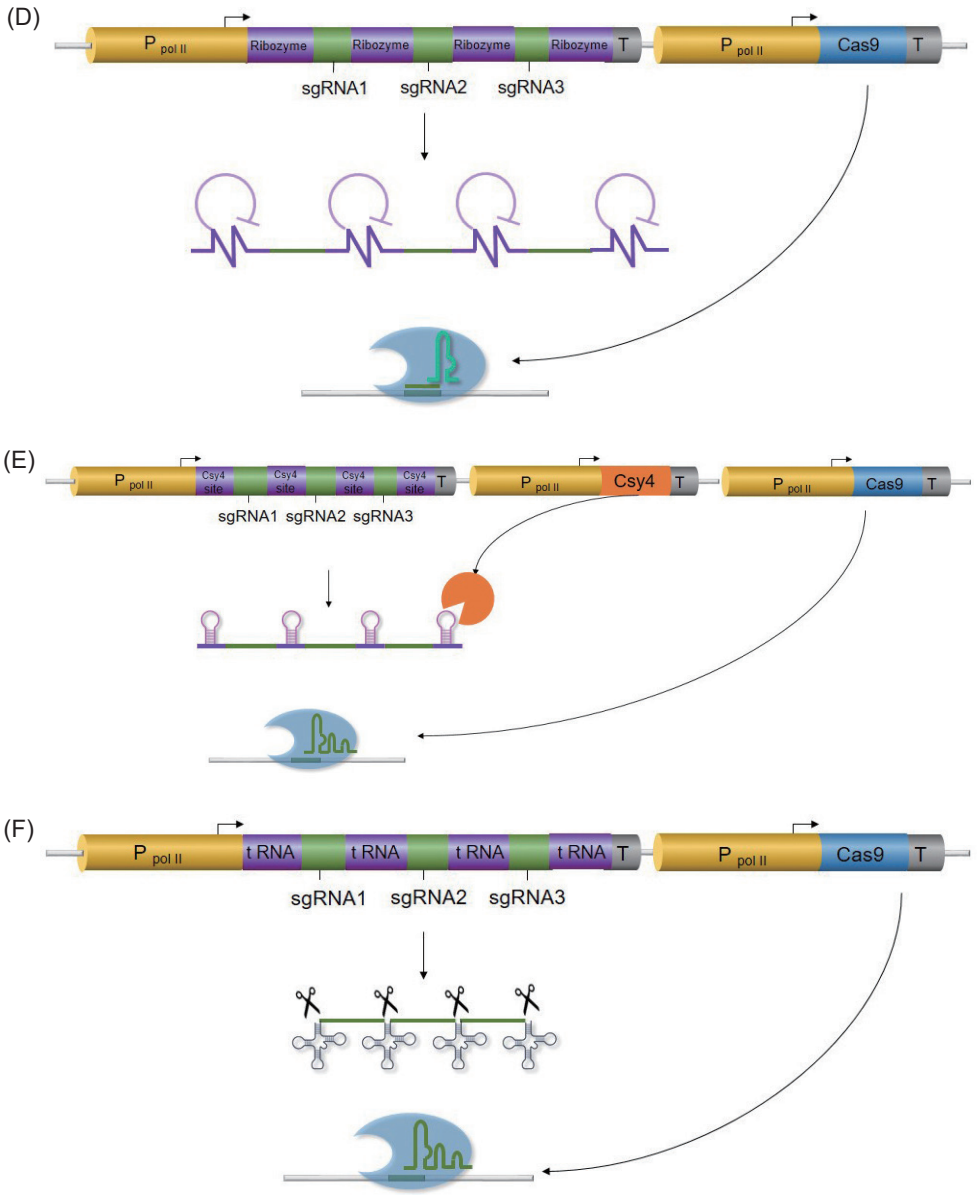


圖 2. 多重 gRNA 表現方式。(A) 獨立表現卡匣：每個 gRNA 有獨立的啟動子與終止子；(B) tracerRNA/RNase III 截切：crRNA 與 tracRNA 結合後，啟動 RNaseIII 進行截切；(C) Cas 12a/Cas 13a/CpfI 截切：不需要 tracrRNA 與 RNase III 即可進行截切；(D) Ribozyme self-cleavage：於 gRNA 的上、下游加上 HH 與 HDV 序列，轉錄產物即可進行自我截切；(E) Csy4 processing：於 gRNA 上游設計 Csy4 辨識序列即可進行截切；(F) tRNA cleaved by RNase：tRNA 初級轉錄產物端點，可被真核生物內生性的 RNase P 與 RNase Z，或細菌中的 RNase E 截切。┌► 表示啟動子。(續)

Fig. 2. Multiplexed gRNA expression approach (McCarty *et al*. 2020). (A) Individual expression cassettes: Each gRNA consists of independent promoter and terminators; (B) tracerRNA/RNase III processing: After the cRNA binds to the tracer RNA, RNase III is activated for truncation; (C) Cas 12a/Cas 13a/CpfI processing: Truncation can be performed without tracrRNA and RNase III; (D) Ribozyme self-cleavage: Self-truncation can be performed by adding HH and HDV sequences upstream and downstream of the gRNA; (E) Csy4 processing: The Csy4 recognition sequence can be designed upstream of the gRNA to truncate; and (F) tRNA cleaved by RNase: The tRNA may be truncated by endogenous RNase P and RNase Z in eucaryotes, or by RNase E in bacteria. ┌► presented the promoters. (contimued)

相比，較適合長片段基因的轉殖。若將獨立表現卡匣分別放在不同的載體，進行共轉殖，則常有轉殖效率低下的問題 (Peremarti *et al*. 2010)，且通常單一農桿菌株只能攜帶單一種質體，前揭獨立表現卡匣策略就需要多種帶有不同表現質體農桿菌進行共感染，常不利於多基因編輯卡匣的同時導入 (Minkenberg *et al*. 2017)。所以如何在單一載體上成功表現多個 gRNA 就顯得相當重要。

原生/內生表現方式

(1) tracerRNA/RNase III processing：其屬於原生 CRISPR-Cas 表現系統之 pre-crRNA 截切方式，根據第二類第二型 (Class II Type II) 系統之 pre-crRNA 截切原理，在 crRNA 的上下游設計與 tracrRNA 互補的重複序列，當初級 RNA 產物與 tracrRNA 結合後，啟動內生的 RNase III 酵素進行 RNA 截切，產生多個 gRNA 片段 (Deltcheva *et al*. 2011; Mikami *et al*. 2017) (圖 2 B)。

(2) Cas 12a/Cas 13a/CpfI processing：屬於原生 CRISPR-Cas 表現系統之 pre-crRNA 截切方式，根據第二類第五型 (Class II Type V) 系統之 pre-crRNA 截切原理設計。Cas 12a/Cas 13a (或稱 Cpf1) 核酸酶約 1,300 個胺基酸，與 Cas9 不同的是 Cpf1 不需要 tracrRNA 也不需要額外的 RNase III 即可獨力完成 pre-crRNA 截切，能與 Cpf1 結合之 gRNA 僅需要 42 nt，其中 19 nt 為 5 端莖環結構 (stem-loop structure)，3 端 23 nt 為目標辨識序列 (Zetsche *et al*. 2015)，正確構型之 pre-crRNA 可截切產生多個 crRNA 片段 (Fonfara *et al*. 2016; Ding *et al*. 2018) (圖 2C)，此策略已成功應用於水稻多重基因編輯 (Wang *et al*. 2017)。

轉錄後截切方式

(1) Ribozyme self-cleavage：該構築方法使用轉錄後截切原理，由於核糖核酸酵素 (ribozyme) 廣泛存在於各物種中，本身是一段 RNA 但具有自我截切 (self-cleavage) 功能，在 gRNA 的上、下游分別加入錘頭狀核糖核酸酵素 (hammerhead ribozyme; HH) 序列與 D 型肝炎病毒核糖核酸酵素 (Hepatitis Delta Virus ribozyme; HDV) 序列，轉錄產物即可進行自我截切，可精確產生 gRNA，該方法也擴展應用於體內多重 gRNAs 的表達 (Lee *et al*. 2016; Xu *et al*. 2016a; He *et al*. 2017) (圖 2D)。

(2) Csy4 processing：該構築方法使用轉錄後截切原理，Csy4 (Cas6f) 屬於第一類第三型 (Class I Type III) CRISPR-Cas 系統的核酸酶，可以辨識初級 RNA 上 28 nt 之莖環結構 (stem-loop structure)，並截切下游 20 nt 位置 (Haurwitz *et al*. 2010)，於 gRNA 上游設計 Csy4 辨識序列即可進行截切，產生多重 gRNAs (圖 2E)，此方法已成功應用於細菌、酵母菌及哺乳動物 (Nissim *et al*. 2014; Ferreira *et al*. 2018; Kurata *et al*. 2018)。在番茄、小麥、大麥原生質體 (protoplast) 及苜蓿皆具有相當好的多重基因編輯效果 (Čermák *et al*. 2017)。但由於 Csy4 截切系統需要額外表達外源的 Csy4 蛋白質，但該蛋白質表現量過高時，易產生細胞毒性，導致取得候選植株的難度提高 (Nissim *et al*. 2014)。

(3) tRNA cleaved by RNase：該構築方法使用轉錄後截切原理，內生性 tRNA 截切是目前廣泛使用於植物、動物甚至是微生物的一種策略，具有以下幾個特性：tRNA 之初級轉錄產物之端點，可被真核生物內生性的 RNase P 與 RNase Z，或細菌中的 RNase E 截切。RNase P 與 RNase Z 截切位置和 pre-tRNA 序列無關，具有受體臂 (acceptor stem)、D 臂 (D-loop arm) 及核糖體辨識區 TψC 臂 (TψC-loop arm) 二級結構即可，tRNA 轉錄常以 polycistronic 型式出現，且 tRNA 基因序列具有 Pol III 啟動子強化元件，內生性的 tRNA 截切系統可處理大量的初級轉錄產物 (Xie *et al*. 2015) (圖 2F)。基於以上特點內生性 tRNA 截切系統適合做為跨物種的多重 gRNA 表現平台，與核糖核酸酵素自我截切策略相比，tRNA 截切策略加入的序列較短，tRNA 選擇多元可避免特定序列重複出現造成的默化現象，

其設計原理是在多個 gRNA 序列間插入 77 bp 長度的 pre-tRNA 序列，此技術已在人類胚胎細胞、甜橙、水稻以及油菜中被廣泛應用於多基因編輯 (Xie *et al*. 2015; Tang *et al*. 2016; Dong *et al*. 2017; Oliva *et al*. 2019; Zhang *et al*. 2021; Huang *et al*. 2022)

多重基因編輯於作物精準育種之應用

多重基因編輯的研究已於水稻、番茄、小麥、馬鈴薯及油菜等作物上，在其產量、營養成分、抗病性、抗逆境能力及對除草劑耐受性等方面，有精準且成功的研究成果 (表 2)，茲介紹如下：

作物產量之精準育種 —— 水稻為例

水稻產量構成要素主要取決於有效穗數、每穗粒數、稔實率及千粒重，是複雜且重要的作物性狀，並受多種數量性狀基因座 (quantitative trait loci; QTLs) 共同調控。已有 21 個調節水稻產量相關性狀的基因被選殖出來，如粒型 (*Grain Size 3*; *GS3*)、粒寬 (*Grain Width*; *GW2* 與 *GW5*)、千粒種 (*Thousand-Grain Weight 6*; *TGW6*)、莖桿直立 (*Dense and erect panicle 1*; *DEP1*) 及每穗粒數 (*Grain number1a*; *Gn1a*) 等基因缺失導致粒重的增加，故為粒重之負調控因子。往昔研究顯示將 *OsGW2*、*OsGW5*、*OsTGW6* 及 *OsGn1a* 等基因，利用 TCTU 系統與獨立表現卡匣的 gRNA 的表現方式進行多重基因編輯，其粒長、粒寬及千粒種分別增加 24.21–25.32%、19.79–20.46% 及 27.13–29.84% (Xu *et al*. 2016b)。此外，非洲稻具抗病、抗蟲及乾旱耐受性，但因其產量低、易倒伏及落粒等缺點，因此常被忽視。Lacchini *et al*. (2020) 利用 TCTU 系統與 tRNA 截切原理，編輯非洲稻 *OsGn1a*、*OsGs3* 及 *OsGW2* 等基因，獲得 *gn1a gs3 gw2* 突變體，其種子重量顯著增加了 24%。上述例子說明多重基因編輯策略確可有效運用在多基因共同調控產量數量性狀之精準育種。

表 2. 作物多重基因編輯的案例。

Table 2. The case of multiple gene editing in plants.

Plant species	Target genes	Method[z]	Application	References
rice	*OsGW2*, *OsGW5*, and *OsTGW6*	A	yield	Xu *et al*. (2016b)
rice	*OsGW2*, *OsGW5*, and *OsTGW6*	B	yield	Lacchini *et al*. (2020)
tomato	*SGR1*, *LCY-E*, *Blc*, *LCY-B1*, *LCY-B2*	A	quality	Li *et al*. (2018b)
tomato	*GABA-TP1*, *GABA-TP2*, *GABA-TP3*, *CAT9*, *SSADH*	A	quality	Li *et al*. (2018a)
potato	*St16DOX*	B	quality	Nakayasu *et al*. (2018)
rice	*GBSS*	B	quality	Ma *et al*. (2015)
tomato	*SlTOM1a/d*, *SlTOM1b*, *SlTOM1c*	A	biotic stress	Ishikawa *et al*. (2022)
rice	*SWEET11*, *SWEET13*, *SWEET14*	B	biotic stress	Oliva *et al*. (2019)
sweet orange	*LOB1*	B	biotic stress	Huang *et al*. (2022)
rapeseed	*BnQCR8*	D	biotic stress	Zhang *et al*. (2021)
rapeseed	*BnaA.WRKY70.a*, *BnaA.WRKY70.b*	A	biotic stress	Sun *et al*. (2018)
	BnaC. WRKY70.b			
tomato	*SlHyPRP1*	A	abiotic stress	Tran *et al*. (2021)
rice	*SR*	B	abiotic stress	Butt *et al*. (2019)
rapeseed	*EPSPS*	C	herbicide stress	Wang *et al*. (2021)
rice	*ALS*	A	herbicide stress	Sun *et al*. (2016)

[z] Multiple gRNAs expression strategies: A: two-component transcriptional unit (TCTU) + individual expression cassettes; B: TCTU + tRNA cleaved by RNase; C: TCTU + Csy4 processing; D: single transcriptional unit (STU) + tRNA cleaved by RNase.

營養與機能成分之精準育種── 以番茄之茄紅素與 γ-胺基丁酸 (γ-aminobutyric acid; GABA)、馬鈴薯之固醇類配醣生物鹼 (steroidal glycoalkaloids; SGA) 及水稻之糯性為例

茄紅素是一種 C40 類胡蘿蔔素，在果實成熟過程中經由類胡蘿蔔素合成路徑所產生，主要依賴異戊烯二磷酸酯 (*isopentenyl diphosphate*; *IPP*) 與其異構體二甲烯丙烯基焦磷酸 (*dimethylallyl disphosphate*; *DMAPP*) 2 種前驅物，*IPP* 與 *DMAPP* 進行縮合反應生成香葉基焦磷酸合酶 (*geranylgeranyl pyrophosphate synthase*; *GGPP*)。然後，2 分子的 *GGPP* 被八氫番茄紅素合成酶 1 (*phytoene synthase 1*, *PSY1*) 催化形成 1 分子無色的 15-順式八氫番茄紅素 (*15-cis-phytoene*)。再經由八氫番茄紅素去氫酶 (*phytoene desaturase*; *PDS*) 的作用產生 ζ-carotene 與其異構物，再經過去飽和作用，將 ζ-carotene 轉換成茄紅素，藉由茄紅素 β-環化酶 1 (*lycopene β-cyclase 1*; *LCY-B1* 與 *LCY-B2*) 與 β-番茄紅素環化酶 (*beta-lycopene cyclase*; *Blc*) 將茄紅素環化生成 β-胡蘿蔔素，另一種途徑是茄紅素 ε-環化酶 (*lycopene ε-cyclase*; *LCY-E*) 與 β-番茄紅素環化酶 (Blc) 將茄紅素環化生成 α-胡蘿蔔素。最終，這些物質可降解為葉黃素、玉米黃質及其他類胡蘿蔔素。Li *et al*. (2018b) 利用雙向系統與獨立表現卡匣的 gRNA 表現方式，採取雙向策略，一是將番茄果實中維持綠色基因 (*Stay-green 1*; *SGR1*) 之轉錄因子進行編輯，使 *SGR1* 無法與 *PSY1* 相互作用，進而促進茄紅素的合成。二是將催化番茄紅素環化的基因，例如 *LCY-E*、*LCY-B1* 與 *LCY-B2*、*LCY-E* 以及 *Blc* 等上述 5 個基因進行編輯，防止茄紅素環化為 α-胡蘿蔔素與 β-胡蘿蔔素，進而提高 5.1 倍茄紅素的積累。

GABA 為大腦的傳導物質，可舒緩情緒與調節血壓 (Inoue *et al*. 2003; Nakamura *et al*. 2009)，可作為現代人工作壓力大最佳的營養補充劑。GABA 主要合成途徑為穀胺酸脫酸酶 (glutamic acid decarboxylase; GAD) 將 L-glutamate 穀胺酸脫羧基而產生 GABA。並進一步被 GABA 轉胺酶 (GABA transaminase; GABA-T) 催化轉變為琥珀酸半醛 (succinic semialdehyde; SSA)，最後則是經由琥珀酸半醛脫氫酶 (SSA dehydrogenase; SSADH) 將琥珀酸半醛催化轉變為琥珀酸 (succinate) 並進入檸檬酸循環 (TCA cycle)。另一方面研究發現另一種陽離子氨基酸轉運蛋白 (cationic amino acid transporter; CAT9) 會將液泡中的 GABA 轉運至粒線體進行分解代謝，影響 GABA 之表現量。因此 GABA-T、SSADHLi、CAT9 等酵素在番茄 GABA 主要合成與代謝途徑扮演關鍵因子。其中 GABA-T 有 2 種異構體：包括丙酮酸依賴性 (*pyruvate-dependent GABA-T*; *GABA-TP*) 與 α-酮戊二酸依賴性 (*α-ketoglutarate-dependent GABA-T*; *GABA-TK*)。只有 *GABA-TP* 基因被證實存在於番茄植物中，而 *GABA-TP* 可再細分成 *GABA-TP1*、*GABA-TP2* 及 *GABA-TP3* 等 3 個基因家族。因此 Li *et al*. (2018a) 將與 *GABA-TP1*、*GABA-TP2*、*GABA-TP3*、*SSADH* 及 *CAT9*，利用 TCTU 系統與獨立表現卡匣的 gRNA 表現方式進行編輯，結果顯示編輯系與野生型番茄相比，葉片 GABA 的含量可增加 19 倍，果實 GABA 亦增加 4 倍。日本於 2021 年 9 月已通過高 GABA 番茄上市 (Gramazio *et al*. 2020)。

馬鈴薯 (*Solanum tuberosum*) 是一種主要的糧食作物，但大部分組織都積累了 SGA，故具苦味與毒性，因此，降低塊莖中的 SGA 含量，是馬鈴薯品質育種的重要目標。Nakayasu *et al*. (2018) 將合成 SGA 生物鹼之 *St16DOX* 基因，設計了 9 個 gRNA，命名為 T1–T9，利用 TCTU 系統與 tRNA 截切原理形成 4 種多位點基因編輯之組合分別為 T1/T2、T3/T4、T5/T6 及 T7/T8/T9，結果顯示所有編輯系之 SGA 含量皆低於對照品種，其中又以 T1/T2_#6 與 T7/T8/T9_#4 兩個獨立品系幾乎不含 SGA。因此馬鈴薯經基因編輯後，毛狀根中無法表現 *St16DOX* 基因與積累 SGA，進而抑制毒性產生。

水稻 *OsWaxy* 基因是編碼顆粒澱粉合成酶 (*granule-bound starch synthase*; *GBSS*) 合成直鏈澱粉主要基因，Ma *et al*. (2015) 設計 3 個 gRNA，利用 TCTU 系統與 tRNA 截切原理，進行水稻 *OsWaxy* 基因編輯，結果顯示產生 1

個或 2 個位點突變的 T_0 植株種子，其直鏈澱粉含量從 14.6% 下降到 2.6%，米質近似於糯米品種，進而改變稻米品質。

提高作物抗病性之精準育種── 以番茄褐色皺果病、水稻白葉枯病及油菜菌核病為例

番茄褐色皺果病毒 (Tomato brown rugose fruit virus; ToBRFV) 為 Tobamovirus 病毒屬，因其可突破番茄抗病基因 *Tm2* 而受到國際檢疫之高度重視。目前已知植物體內的跨膜蛋白質 *TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION1* (*TOM1*) 參與病毒複製，而番茄中具有 5 個 *TOM1* 同源基因，分別為 *SlTOM1a*、*SlTOM1b*、*SlTOM1c*、*SlTOM1d* 及 *SlTOM1e*，由於 *SlTOM1e* 表現量極低，而 *SlTOM1a* 與 *SlTOM1d* 同源性高，Ishikawa *et al*. (2022) 以 TCTU 表現系統配合獨立卡匣之 gRNA 表現方式，設計 3 種 sgRNA，分別針對 *SlTOM1a/d*、*SlTOM1b* 及 *SlTOM1c* 基因進行編輯，所得三重突變體 *Sltom1bcd*、*Sltom1abd* 及 *Sltom1abc* 於接種後，仍可偵測到 ToBRFV，而 *Sltom1acd* 接種 21 d 後才偵測到低水平的 ToBRFV，所有 *TOM1* 同源基因皆突變之 *Sltom1abcd* 於接種後 21 d 完全無病徵，且偵測不到 ToBRFV。

水稻白葉枯病 (bacterial blight) 之病原為 *Xanthomona oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) 分泌多種類轉錄活化因子 (transcription-activator-like effectors; TALEs)，如 PthXo1、PthXo2A、PthXo2B、PthXo2C、PthXo3、TalC、TalF 及 AvrXa7 等，可結合水稻蔗糖轉運蛋白質基因 *SWEET* 基因家族 *SWEET11*、*SWEET13* 及 *SWEET14* 啟動子上的調節因子結合區 (effector binding element; EBE)，啟動相關基因表現而改變糖的代謝，加速病原菌侵入的繁殖力，例如 Oliva *et al*. (2019) 利用 TCTU 表現系統與 tRNA 截切原理，同時編輯水稻 6 個 EBEs 序列，取得 5 個 EBEs 位點同時發生編輯之突變株，對於不同地區之 Xoo 具有廣效型的抗性。相同的策略也應用於柑橘細菌性潰瘍病 (citrus bacterial canker) 抗性提升，柑橘細菌性潰瘍病由 *X. citri* subsp. *citri* (Xcc) 所引起，Xcc 分泌類轉錄活化因子 PthA4，PthA4 進入細胞核後會與植物的潰瘍感病基因 (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES 1*; *LOB1*) 啟動子之 EBE 結合，進而活化 *LOB1* 的表現。由於甜橙 (*Citrus sinensis*) 來自柚子 (*C. maxima*) 與柑橘 (*C. reticulata*) 的種間雜交，大多數品種基因組都具有 2 個來源的等位基因，對 Xcc 不具抗性，例如 Huang *et al*. (2022) 針對第 I 型與第 II 型 *CsLOB1* 基因啟動子 EBE 序列設計 3 個 gRNA，利用 TCTU 表現系統與 tRNA 截切原理進行甜橙多重基因編輯，取得 *CsLOB1* 之同型結合編輯系，該編輯係具有良好的 Xcc 抗性。

油菜 (*Brassica napus* L.) 是世界重要的油料作物，常受菌核病 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 與灰黴病 (*Botrytis cinerea*) 影響產量，已知道菌核病的小型分泌致病相關蛋白質 (small secreted virulence-related protein; SsSSVP) 為致病因子，可與油菜粒線體之細胞色素 b-c1 複合體保守次單元 (cytochrome b-c1 complex conserved subunit) BnQCR8 結合，使 BnQCR8 的分布由粒線體轉移到細胞質，進而影響植物呼吸作用進行；而油菜為異源四倍體，其中，歐洲油菜品種 'westra' 具有 8 個 *BnQCR8* 同源基因，利用 STU 表現系統配合 tRNA 截切原理進行 *BnQCR8* 多重基因編輯，降低 BnQCR8 與 SsSSVP 的結合能力，其中 7 個 *BnQCR8* 基因同時被編輯植株，具有最高的抗病性，編輯系抗病能力隨著 *BnQCR8* 基因編輯數量的增加而遞增，且不影響產量 (Zhang *et al*. 2021)。*WRKY* 轉錄因子與多種植物抗病反應，Sun *et al*. (2018) 應用 TCTU 表現系統配合獨立卡匣之 gRNA 表現原理，設計多重基因編輯載體，針對 4 個油菜 *BnWRKY70* 同源基因 *BnaA.WRKY70.a*、*BnaA.WRKY70.b*、*BnaC.WRKY70.a* 及 *BnaC.WRKY70.b* 進行編輯，其中 *BnaA.WRKY70.a*、*BnaA.WRKY70.b* 及 *BnaC.WRKY70.b* 同時被編輯後，油菜編輯系對核盤菌屬 (*Sclerotinia*) 具有良好的抗病性。

提升作物抗逆境能力之精準育種── 以番茄之富含脯氨酸的雜合蛋白 (HyPRPhybrid proline rich proteins; HyPRPs) 與水稻絲氨酸/精氨酸豐富蛋白質 (serine/arginine-rich proteins; SR) 為例

作物生長的環境逆境，包括乾旱、鹽害、溫度及重金屬等。對於作物生存面臨重大挑戰。其中乾旱與鹽害是對全球種植的最重要威脅之一 (Van Zelm *et al*. 2020)，由於鹽分導

致氣孔關閉、水分吸收減少及最終降低植物的光合效率。已知植物富含脯氨酸的雜合蛋白質 (HyPRPs) 為植物細胞壁結構蛋白質，其表現是受到多種環境逆境等影響，例如病原菌感染、傷口、乾旱及鹽分 (Goodwin *et al*. 1996; Otte & Barz 2000)。番茄 *SlHyPRP1* 已被證明是多重逆境反應的負調節因子，當番茄 *SlHyPRP1* 基因表現受到抑制時，會導致 SOD 與過氧化氫酶等抗氧化酶的表現量增強，從而提高耐受性 (Li *et al*. 2016)。Tran *et al*. (2021) 將 *SlHyPRP1* 基因上 N 端結構域 (PRD) 與保守的八半胱氨酸基序 (8CM) C 端結構利用 TCTU 系統配合獨立表現卡匣 gRNA 表現原理，設計多重基因編輯載體，取得 8 種不同組合之編輯系，並於不同鹽濃度下進行發芽期試驗，結果顯示於 150 mM NaCl 濃度下，以 PRD 結構域被移除之 *PR1v1* 與 *PR3* 編輯系耐鹽性表現最好。

SR 蛋白質在真核生物中參與 pre-mRNA 剪接，經過一連串的加工後，形成不同的成熟 RNA，進一步轉譯成不同蛋白，因此是基因表現調控的重要機制。水稻有 22 個 SR 蛋白質成員，是現有已知物種中最多的，可分為 6 個亞科。其中 3 個亞科 (SR、RSZ 及 SC) 在真核生物中是保守的，而其餘的 (SCL、RS2Z 及 RS) 是植物專一所有。在植物中，只有阿拉伯芥 SR 蛋白質被廣泛研究，大多數 SR 突變體對鹽、ABA、乾旱及重金屬等非生物逆境具有高度敏感，因此利用 TCTU 系統配合 tRNA 截切原理編輯水稻 SR 基因家族，所產生的各種突變體，將有助於探討 SR 蛋白質在植物生長、發育及逆境下的分子作用 (Butt *et al*. 2019)。

提高對除草劑耐受性之精準育種 —— 以 *enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase* (*EPSPS*) 與 乙酰乳酸合酶 (*acetolactate synthase*; *ALS*) 基因為例

有效的控制雜草可以維持油菜產量與品質。Wang *et al*. (2021) 將受除草劑影響的 *EPSPS* 基因，利用 TCTU 系統配合 Cys4 截切原理，將野生型 (WT) *BnaC04EPSPS* 基因片段上 2 個 sgEPSPS1t and sgEPSPS2t 的編輯位點，透過 homology direct repair (HDR) 同源基因置換的方式，將目標位點置換成 TIPS 或 LFGAAGMCRL 氨基酸殘基，所得之基因編輯系生長至 12 d 大的幼苗時，以 800× 稀釋的草甘膦溶液 (Roundup, Monsanto, Creve Coeur, MO, USA) 進行噴灑處理，結果發現 10 d 後全部 TIPS 與 LFGAAGMCRL 突變植株正常生長，沒有損傷症狀，而野生型植株則生長矮小，葉片枯萎。由此可知，學者透過此次基因編輯的策略，確可顯著地提升植株對嘉磷賽除草劑的耐受性。另，ALS 是一種合成 lencine、isoleucine 及 valine 等胺基酸支鏈合成的關鍵酵素，而雙草醚 (bispyribac-sodium) 除草劑會抑制此酵素活性，進而導致植株死亡。若利用 TCTU 系統與獨立表現卡匣 gRNA 的表現方式，透過 HDR 同源基因置換將 *ALS* 基因位於 W548 的序列，由色氨酸 (Trp) 變成白氨酸 (Leu)，同時將另外一個位於 S627 的序列位點，由絲氨酸 (Ser) 變成異白氨酸 (Ilu)，結果發現所獲得的編輯系，可在 100 mM 的雙草醚除草劑處理下存活。因此，學者透過此次基因編輯的策略，確可顯著地提升植株對雙草醚除草劑的耐受性 (Sun *et al*. 2016)。

結論

綜合上述，多重基因編輯已廣泛用植物基因調節與基因功能探勘，透過多重基因編輯同時編輯多個共同調控目標性狀之基因，已成功運用於水稻、小麥、玉米、番茄及馬鈴薯等主要糧作其相關產量、抗病、營養成分及環境逆境等重要性狀之改良。全球氣候變遷過程，農業生產不穩定、糧食生產受到影響且生物多樣性逐漸消失，作物正面臨生物性與非生物性逆境的環境威脅，農業生產面臨許多考驗。因此，多重基因編輯技術在農作物改良與植物基因的功能探勘更顯重要，本文章回顧多重基因編輯之載體、多 gRNA 表現方式及其特性與優缺點等，並舉例說明成功的案例，冀能提供相關資訊，針對欲改良作物的特性與育種目的，挑選適合之編輯策略，更能夠精準地掌握特定性狀，縮短育種時間與減少人力，並發展出更多更具潛力的作物品系，使各種作物能夠在不斷變化的氣候變遷中適應生存，確保未來全球的糧食安全。

引用文獻

Belele, C. L., L. Sidorenko, M. Stam, R. Bader, M. A. Arteaga-Vazquez, and V. L. Chandler. 2013. Specific tandem repeats are sufficient for paramutation-induced trans-generational silencing. PLoS Genet. 9:e1003773. doi:10.1371/journal.pgen.1003773

Bondino, H. G. and E. M. Valle. 2009. A small intergenic region drives exclusive tissue-specific expression of the adjacent genes in Arabidopsis thaliana. BMC Mol. Biol. 10:95. doi:10.1186/1471-2199-10-95

Butt, H., A. Piatek, L. Li, A. S. N. Reddy, and M. M. Mahfouz. 2019. Multiplex CRISPR mutagenesis of the serine/arginine-rich (SR) gene family in rice. Genes 10:596. doi:10.3390/genes10080596

Cao, H. X., W. Wang, H. T. T. Le, and G. T. H. Vu. 2016. The power of CRISPR-Cas9-induced genome editing to peed up plant breeding. Intl. J. Genomics 2016:5078796. doi:10.1155/2016/5078796

Čermák, T., S. J. Curtin, J. Gil-Humanes, R. Čegan, T. J. Y. Kono, E. Konečná, J. J. Belanto, C. G. Starker, J. W. Mathre, R. L. Greenstein, and D. F. Voytas. 2017. A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants. Plant Cell 29:1196–1217. doi:10.1105/tpc.16.00922

Chen, K., Y. Wang, R. Zhang, H. Zhang, and C. Gao. 2019. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. Annu. Rev. Plant Biol. 70:667–697. doi:10.1146/annurev-arplant-050718-100049

Deltcheva, E., K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel, and E. Charpentier. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature 471:602–607. doi:10.1038/nature09886

Dhadi, S. R., A. Deshpande, K. Driscoll, and W. Ramakrishna. 2013. Major *cis*-regulatory elements for rice bidirectional promoter activity reside in the 5'-untranslated regions. Gene 526:400–410. doi:10.1016/j.gene.2013.05.060

Ding, D., K. Chen, Y. Chen, H. Li, and K. Xie. 2018. Engineering introns to express RNA guides for Cas9- and Cpf1-mediated multiplex genome editing. Mol. Plant 11:542–552. doi:10.1016/j.molp.2018.02.005

Dong, F., K. Xie, Y. Chen, Y. Yang, and Y. Mao. 2017. Polycistronic tRNA and CRISPR guide-RNA enables highly efficient multiplexed genome engineering in human cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 482:889–895. doi:10.1016/j.bbrc.2016.11.129

Enfissi, E. M. A., M. Drapal, L. Perez-Fons, M. Nogueira, H. M. Berry, J. Almeida, and P. D. Fraser. 2021. New plant breeding techniques and their regulatory implications: An opportunity to advance metabolomics approaches. J. Plant Physiol. 258–259:153378. doi:10.1016/j.jplph.2021.153378

Fang, Y., J. Jiang, X. Hou, J. Guo, X. Li, D. Zhao, and X. Xie. 2022. Plant protein-coding gene families: Their origin and evolution. Front. Plant Sci. 13:995746. doi:10.3389/fpls.2022.995746

Ferreira, R., C. Skrekas, J. Nielsen, and F. David. 2018. Multiplexed CRISPR/Cas9 genome editing and gene regulation using Csy4 in *Saccharomyces cerevisiae*. ACS Synth. Biol. 7:10–15. doi:10.1021/acssynbio.7b00259

Fonfara, I., H. Richter, M. Bratovič, A. Le Rhun, and E. Charpentier. 2016. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. Nature 532:517–521. doi:10.1038/nature17945

Goodwin, W., J. A. Pallas, and G. I. Jenkins. 1996. Transcripts of a gene encoding a putative cell wall-plasma membrane linker protein are specifically cold-induced in *Brassica napus*. Plant Mol. Biol. 31:771–781.

Gramazio, P., M. Takayama, and H. Ezura. 2020. Challenges and prospects of new plant breeding techniques for GABA improvement in crops: Tomato as an example. Front. Plant Sci. 11:577980. doi:10.3389/FPLS.2020.577980

Haurwitz, R. E., M. Jinek, B. Wiedenheft, K. Zhou, and J. A. Doudna. 2010. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. Science 329:1355–1358. doi:10.1126/science.1192272

He, Y., T. Zhang, N. Yang, M. Xu, L. Yan, L. Wang, R. Wang, and Y. Zhao. 2017. Self-cleaving ribozymes enable the production of guide RNAs from unlimited choices of promoters for CRISPR/Cas9 mediated genome editing. J. Genet. Genomics 44:469–472. doi:10.1016/j.jgg.2017.08.003

Ho, B. X., S. J. H. Loh, W. K. Chan, and B. S. Soh. 2018. *In vivo* genome editing as a therapeutic approach. Intl. J. Mol. Sci. 19:2721. doi:10.3390/ijms19092721

Huang, X., Y. Wang, and N. Wang. 2022. Highly efficient generation of canker-resistant sweet orange enabled by an improved CRISPR/Cas9 system. Front. Plant Sci. 12:769907. doi:10.3389/fpls.2021.769907

Inoue, K., T. Shirai, H. Ochiai, M. Kasao, K. Hayakawa, M. Kimura, and H. Sansawa. 2003. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. Eur. J. Clin. Nutr. 57:490–495. doi:10.1038/sj.ejcn.1601555

Ishikawa, M., T. Yoshida, M. Matsuyama, Y. Kouzai, A.

Kano, and K. Ishibashi. 2022. Tomato brown rugose fruit virus resistance generated by quadruple knockout of homologs of *TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION*$_1$ in tomato. Plant Physiol. 189:679–686. doi:10.1093/plphys/kiac103

Kim, H., S. T. Kim, J. Ryu, B. C. Kang, J. S. Kim, and S. G. Kim. 2017. CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. Nat. Commun. 8:14406. doi:10.1038/ncomms14406

Kurata, M., N. K. Wolf, W. S. Lahr, M. T. Weg, M. G. Kluesner, S. Lee, K. Hui, M. Shiraiwa, B. R. Webber, and B. S. Moriarity. 2018. Highly multiplexed genome engineering using CRISPR/Cas9 gRNA arrays. PLoS ONE 13:e0198714. doi:10.1371/journal.pone.0198714

Lacchini, E., E. Kiegle, M. Castellani, H. Adam, S. Jouannic, V. Gregis, and M. M. Kater. 2020. CRISPR-mediated accelerated domestication of African rice landraces. PLoS ONE 15:e0229782. doi:10.1371/journal.pone.0229782

Lee, R. T. H., A. S. M. Ng, and P. W. Ingham. 2016. Ribozyme mediated gRNA generation for *in vitro* and *in vivo* CRISPR/Cas9 mutagenesis. PLoS ONE 11:e0166020. doi:10.1371/journal.pone.0166020

Li, J., B. Ouyang, T. Wang, Z. Luo, C. Yang, H. Li, W. Sima, J. Zhang, and Z. Ye. 2016. HyPRP1 gene suppressed by multiple stresses plays a negative role in abiotic stress tolerance in tomato. Front. Plant Sci. 7:1–14. doi:10.3389/fpls.2016.00967

Li, R., R. Li, X. Li, D. Fu, B. Zhu, H. Tian, Y. Luo, and H. Zhu. 2018a. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering of γ-aminobutyric acid levels in *Solanum lycopersicum*. Plant Biotechnol. J. 16:415–427. doi:10.1111/pbi.12781

Li, X., Y. Wang, S. Chen, H. Tian, D. Fu, B. Zhu, Y. Luo, and H. Zhu. 2018b. Lycopene is enriched in tomato fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. Front. Plant Sci. 9:559. doi:10.3389/fpls.2018.00559

Lian, J., M. HamediRad, S. Hu, and H. Zhao. 2017. Combinatorial metabolic engineering using an orthogonal tri-functional CRISPR system. Nat. Commun. 8:1688. doi:10.1038/s41467-017-01695-x

Liang, Z., K. Chen, T. Li, Y. Zhang, Y. Wang, Q. Zhao, J. Liu, H. Zhang, C. Liu, Y. Ran, and C. Gao. 2017. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat. Commun. 8:14261. doi:10.1038/ncomms14261

Lowder, L., A. Malzahn, and Y. Qi. 2016. Rapid evolution of manifold CRISPR systems for plant genome editing. Front. Plant Sci. 7:1683. doi:10.3389/fpls.2016.01683

Lusser, M., C. Parisi, D. Plan, and E. Rodriguez-Cerezo. 2011. New Plant Breeding Techniques: State-of-the-Art and Prospects for Commercial Development. JRC Sci. Tech. Rep. Publications Office of the European Union. Luxembourg. 218 pp. doi:10.2791/54761

Ma, X., Q. Zhang, Q. Zhu, W. Liu, Y. Chen, R. Qiu, B. Wang, Z. Yang, H. Li, Y. Lin, Y. Xie, R. Shen, S. Chen, Z. Wang, Y. Chen, J. Guo, L. Chen, X. Zhao, Z. Dong, and Y. G. Liu. 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Mol. Plant 8:1274–1284. doi:10.1016/j.molp.2015.04.007

Malnoy, M., R. Viola, M. H. Jung, O. J. Koo, S. Kim, J. S. Kim, R. Velasco, and C. N. Kanchiswamy. 2016. DNA-free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. Front. Plant Sci. 7:1904. doi:10.3389/fpls.2016.01904

McCarty, N. S., A. E. Graham, L. Studená, and R. Ledesma-Amaro. 2020. Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. Nat. Commun. 11:1281. doi:10.1038/s41467-020-15053-x

Mikami, M., S. Toki, and M. Endo. 2015. Parameters affecting frequency of CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in rice. Plant Cell Rep. 34:1807–1815. doi:10.1007/s00299-015-1826-5

Mikami, M., S. Toki, and M. Endo. 2017. In planta processing of the SpCas9–gRNA complex. Plant Cell Physiol. 58:1857–1867. doi:10.1093/pcp/pcx154

Minkenberg, B., M. Wheatley, and Y. Yang. 2017. CRISPR/Cas9-enabled multiplex genome editing and its application. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 149:111–132. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.05.003

Nakamura, H., T. Takishima, T. Kometani, and H. Yokogoshi. 2009. Psychological stress-reducing effect of chocolate enriched with γ-aminobutyric acid (GABA) in humans: Assessment of stress using heart rate variability and salivary chromogranin A. Intl. J. Food Sci. Nutr. 60:106–113. doi:10.1080/09637480802558508

Nakayasu, M., R. Akiyama, H. J. Lee, K. Osakabe, Y. Osakabe, B. Watanabe, Y. Sugimoto, N. Umemoto, K. Saito, T. Muranaka, and M. Mizutani. 2018. Generation of α-solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the *St16DOX* gene. Plant Physiol Biochem. 131:70–77. doi:10.1016/j.plaphy.2018.04.026

Nissim, L., S. D. Perli, A. Fridkin, P. Perez-Pinera, and T. K. Lu. 2014. Multiplexed and programmable regulation of gene networks with an integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit in human cells. Mol. Cell

54:698–710. doi:10.1016/j.molcel.2014.04.022

Oliva, R., C. Ji, G. Atienza-Grande, J. C. Huguet-Tapia, A. Perez-Quintero, T. Li, J. S. Eom, C. Li, H. Nguyen, B. Liu, F. Auguy, C. Sciallano, V. T. Luu, G. S. Dossa, S. Cunnac, S. M. Schmidt, I. H. Slamet-Loedin, C. Vera Cruz, B. Szurek, W. B. Frommer, F. F. White, and B. Yang. 2019. Broad-spectrum resistance to bacterial blight in rice using genome editing. Nat. Biotechnol. 37:1344–1350. doi:10.1038/s41587-019-0267-z

Otte, O and W. Barz. 2000. Characterization and oxidative *in vitro* cross-linking of an extensin-like protein and a proline-rich protein purified from chickpea cell walls. Phytochemistry 53:1–5. doi:10.1016/s0031-9422(99)00463-x

Peremarti, A., R. M. Twyman, S. Gómez-Galera, S. Naqvi, G. Farré, M. Sabalza, B. Miralpeix, S. Dashevskaya, D. Yuan, K. Ramessar, P. Christou, C. Zhu, L. Bassie, and T. Capell. 2010. Promoter diversity in multigene transformation. Plant Mol. Biol. 73:363–378. doi:10.1007/s11103-010-9628-1

Qiao, X., Q. Li, H. Yin, K. Qi, L. Li, R. Wang, S. Zhang, and A. H. Paterson. 2019. Gene duplication and evolution in recurring polyploidization–diploidization cycles in plants. Genome Biol. 20:38. doi:10.1186/s13059-019-1650-2

Ren, Q., Z. Zhong, Y. Wang, Q. You, Q. Li, M. Yuan, Y. He, C. Qi, X. Tang, X. Zheng, T. Zhang, Y. Qi, and Y. Zhang. 2019. Bidirectional promoter-based CRISPR-Cas9 systems for plant genome editing. Front. Plant Sci. 10:1173. doi:10.3389/fpls.2019.01173

Schwarz, Z., S. O. Jolly, A. A. Steinmetz, and L. Bogorad. 1981. Overlapping divergent genes in the maize chloroplast chromosome and *in vitro* transcription of the gene for $tRNA^{His}$. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:3423–3427. doi:10.1073/pnas.78.6.3423

Shin, R., M. J. Kim, and K. H. Paek. 2003. The *CaTin1* (*Capsicum annuum* TMV-induced Clone 1) and *CaTin1-2* genes are linked head-to-head and share a bidirectional promoter. Plant Cell Physiol. 44:549–554. doi:10.1093/pcp/pcg069

Subburaj, S., S. J. Chung, C. Lee, S. M. Ryu, D. H. Kim, J. S. Kim, S. Bae, and G. J. Lee. 2016. Site-directed mutagenesis in *Petunia* × *hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins. Plant Cell Rep. 35:1535–1544. doi:10.1007/s00299-016-1937-7

Sun, Q., L. Lin, D. Liu, D. Wu, Y. Fang, J. Wu, and Y. Wang. 2018. CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing of the *BnWRKY11* and *BnWRKY70* genes in *Brassica napus* L. Intl. J. Mol. Sci. 19:2716. doi:10.3390/ijms19092716

Sun, Y., X. Zhang, C. Wu, Y. He, Y. Ma, H. Hou, X. Guo, W. Du, Y. Zhao, and L. Xia. 2016. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. Mol. Plant 9:628–631. doi:10.1016/j.molp.2016.01.001

Svitashev, S., C. Schwartz, B. Lenderts, J. K. Young, and A. Mark Cigan. 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat. Commun. 7:13274. doi:10.1038/ncomms13274

Tang, X., X. Zheng, Y. Qi, D. Zhang, Y. Cheng, A. Tang, D. F. Voytas, and Y. Zhang. 2016. A single transcript CRISPR-Cas9 system for efficient genome editing in plants. Mol. Plant 9:1088–1091. doi:10.1016/j.molp.2016.05.001

Tran, M. T., D. T. H. Doan, J. Kim, Y. J. Song, Y. W. Sung, S. Das, E. J. Kim, G. H. Son, S. H. Kim, T. Van Vu, and J. Y. Kim. 2021. CRISPR/Cas9-based precise excision of SlHyPRP1 domain(s) to obtain salt stress-tolerant tomato. Plant Cell Rep. 40:999–1011. doi:10.1007/s00299-020-02622-z

Van Zelm, E., Y. Zhang, and C. Testerink. 2020. Salt tolerance mechanisms of plants. Annu. Rev. Plant Biol. 71:403–433. doi:10.1146/annurev-arplant-050718-100005

Wang, C., D. Ding, R. Yan, X. Yu, W. Li, and M. Li. 2008. A novel bi-directional promoter cloned from melon and its activity in cucumber and tobacco. J. Plant Biol. 51:108–115. doi:10.1007/BF03030719

Wang, M., Y. Mao, Y. Lu, X. Tao, and J. K. Zhu. 2017. Multiplex gene editing in rice using the CRISPR-Cpf1 system. Mol. Plant 10:1011–1013. doi:10.1016/j.molp.2017.03.001

Wang, M., Y. Mao, Y. Lu, Z. Wang, X. Tao, and J. K. Zhu. 2018. Multiplex gene editing in rice with simplified CRISPR-Cpf1 and CRISPR-Cas9 systems. J. Integr. Plant Biol. 60:626–631. doi:10.1111/jipb.12667

Wang, Z., L. Wan, Q. Xin, X. Zhang, Y. Song, P. Wang, D. Hong, Z. Fan, and G. Yang. 2021. Optimizing glyphosate tolerance in rapeseed by CRISPR/Cas9-based geminiviral donor DNA replicon system with Csy4-based single-guide RNA processing. J. Exp. Bot. 72:4796–4808. doi:10.1093/jxb/erab167

Woo, J. W., J. Kim, S. I. Kwon, C. Corvalán, S. W. Cho, H. Kim, S. G. Kim, S. T. Kim, S. Choe, and J. S. Kim. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Nat. Biotechnol. 33:1162–1164. doi:10.1038/nbt.3389

Xie, K., B. Minkenberg, and Y. Yang. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. Proc.

Natl. Acad. Sci. 112:3570–3575. doi:10.1073/pnas.1420294112

Xu, L., L. Zhao, Y. Gao, J. Xu, and R. Han. 2016a. Empower multiplex cell and tissue-specific CRISPR-mediated gene manipulation with self-cleaving ribozymes and tRNA. Nucleic Acids Res. 45:e28. doi:10.1093/nar/gkw1048

Xu, R., R. Qin, H. Li, J. Li, J. Yang, and P. Wei. 2019. Enhanced genome editing in rice using single transcript unit CRISPR-*Lb*Cpf1 systems. Plant Biotechnol. J. 17:553–555. doi:10.1111/pbi.13028

Xu, R., Y. Yang, R. Qin, H. Li, C. Qiu, L. Li, P. Wei, and J. Yang. 2016b. Rapid improvement of grain weight via highly efficient CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing in rice. J. Genet. Genomics 43:529–532. doi:10.1016/j.jgg.2016.07.003

Yoshioka, S., W. Fujii, T. Ogawa, K. Sugiura, and K. Naito. 2016. Development of a mono-promoter-driven CRISPR/Cas9 system in mammalian cells. Sci. Rep. 5:18341. doi:10.1038/srep18341

Zafar, S. A., S. S. E. A. Zaidi, Y. Gaba, S. L. Singla-Pareek, O. P. Dhankher, X. Li, S. Mansoor, and A. Pareek. 2020. Engineering abiotic stress tolerance via CRISPR/Cas-mediated genome editing. J. Exp. Bot. 71:470–479. doi:10.1093/jxb/erz476

Zetsche, B., J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, I. M. Slaymaker, K. S. Makarova, P. Essletzbichler, S. E. Volz, J. Joung, J. van der Oost, A. Regev, E. V. Koonin, and F. Zhang. 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell 163:759–771. doi:10.1016/j.cell.2015.09.038

Zhang, X., J. Cheng, Y. Lin, Y. Fu, J. Xie, B. Li, X. Bian, Y. Feng, W. Liang, Q. Tang, H. Zhang, X. Liu, Y. Zhang, C. Liu, and D. Jiang. 2021. Editing homologous copies of an essential gene affords crop resistance against two cosmopolitan necrotrophic pathogens. Plant Biotechnol. J. 19:2349–2361. doi:10.1111/pbi.13667

Zimny, T. 2022. New genomic techniques and their European Union reform. Potential policy changes and their implications. Front. Bioeng. Biotechnol. 10:1019081. doi:10.3389/fbioe.2022.1019081

Application of Multiple Gene Editing in Plant Precision Breeding

Yi-Wen Wang[1,**], Han-Wei Chen[2,**], Shuen-Chi You[2], Jau-Yueh Wang[2], and Da-Gin Lin[3,*]

Abstract

Wang, Y. W., H. W. Chen, S. C. You, J. Y. Wang, and D. G. Lin. 2023. Application of multiple gene editing in plant precision breeding. J. Taiwan Agric. Res. 72(3):181–196.

Multiple gene editing is one of the highly efficient tools for novel precision breeding. Since two or more different DNA sites in the genome can be edited simultaneously, it is suitable for the exploration of important traits regulated by quantitative trait genes or homologous gene families. The systems of multiplex gene editing can be roughly divided into three modes: zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and CRISPR/Cas. Among them, CRISPR/Cas has become the mainstream due to its simple operation, high editing efficiency, and low cost. Therefore, this article mainly discusses the advanced multiple gene editing system that was developed based on CRISPR/Cas. Furthermore, the subject will focus on the editing purpose, vector construction expression system, multiple gRNA expression methods, and successful examples in rice, wheat, corn, rape, tomato, potato and other food and economically important crops. We hope that this article can serve as a reference for researchers conducting related research.

Key words: Multiple gene editing, Precision breeding, Quantitative trait genes, Homologous genes.

Received: January 6, 2023; Accepted: May 7, 2023.

* Corresponding author, e-mail: dagin@tari.gov.tw

** These authors contributed equally to this work.

[1] Contract Assistant Research Fellow, Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

[2] Assistant Research Fellows, Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

[3] Contract Associate Research Fellow, Crop Genetic Resources and Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.