

出國報告（出國類別：研究）

設施番茄重要性狀之選拔與 育種合作研發

服務機關：農業試驗所
姓名職稱：康樂 助理研究員
派赴國家：美國
出國期間：107/8/19-108/8/18
報告日期：108/8/22

摘要

本計畫將人員派赴美國佛羅里達大學墨西哥灣沿岸教育及推廣中心(GCREC, UF/IFAS)進行包含抗病、耐熱及高品質等設施番茄所需之重要特性的育種選拔研習一年，此期間受訓人員實際參與並進行番茄黃化捲葉病毒、番茄嵌紋病毒、萎凋病菌、斑點病菌、細菌性斑點病菌及青枯病菌之接種及病徵評估、應用分子標誌輔助佛羅里達大學番茄抗病育種、並在耐熱及高品質番茄選育試驗上進行合作研發，相關的研習成果可提升我國公部門針對目前正蓬勃發展之設施番茄需求進行快速育種並提升精準度，並增進受訓人員之國際視野及交流能力。

目次

摘要.....	2
本文	
目的.....	4
過程.....	5
第一季.....	5
第二季.....	6
第三季.....	8
第四季.....	9
心得與建議.....	10
附錄.....	11

本文

目的

番茄是一種原產於南美洲之重要的全球性蔬菜，我國則自日治時期開始較有系統地引入栽培，剛開始是以加工番茄為主，之後逐漸轉向鮮食使用，而自從小果番茄‘聖女’問世以來，番茄更是除了一般入菜使用外，添增了以水果形式食用的市場，根據我國 107 年農業統計年報顯示目前食用番茄栽培面積約 4415 公頃，位居我國蔬菜作物栽培面積排名第六，產量共約 10.8 萬噸，是我國重要蔬菜之一。而為了降低氣候影響及增進果實品質，使用農業設施來進行番茄生產的面積也逐步增加，至 104 年農業普查結果顯示我國設施栽培面積已超過番茄栽培總面積之 32%，也就是幾乎三分之一的番茄已轉成設施栽培。

不過設施栽培雖然可以減少降雨的危害及降低一些大型害蟲的風險，但由於設施內通風不如露天環境優良，內部積溫嚴重，而高溫導致番茄著果不良，另一方面許多小型害蟲如溫室粉蝨在溫室內繁衍快速、由其傳播之病害如黃化捲葉病毒更是造成了生產的重大困境，且溫室除溼困難，一早的露水仍有利於諸多葉部病害如晚疫病之發生，加上設施一旦建設完成，內部由於不若露天田容易進行輪作，連作障礙如根瘤線蟲、青枯病等問題也容易隨之發生。為了降低這些生物及非生物逆境，運用適合設施栽培、具有抗耐性之品種為一種很有效的方法。

目前番茄自從解序後基因體發展快速、有眾多已知基因可進行運用，但一方面如耐熱、高產、高品質等特性一般認知為數量遺傳牽扯大量基因及彼此的交互作用、另一方面番茄面臨的病害眾多，如僅使用主效抗耐基因仍然必須聚合多個抗性基因，如何善用近代生物科技輔助選育具有良好園藝性狀且具有良好抗性的品系仍需經驗累積及傳承。

綜觀全球發展現況，美國為農業科技先進國家，根據聯合國糧農組織資料顯示 2017 年番茄年產量占全世界第四位，僅次於中國、印度及土耳其，而佛羅里達州番茄產量佔美國約一半，該州氣候類似我國較為濕熱，番茄生產面臨的自然環境也與我國較為相近，而佛羅里達大學墨西哥灣沿岸教育及推廣中心的番茄育種計畫自 1922 年起已經持續研發接近百年，歷年來育成‘Marglobe’、‘Walter’、‘Florida MH-1’、‘Micro-Tom’等著名品種，而 F1 品系‘FL47’廣泛種植於佛州地區，至今仍是重要品系，近年來更是發表了 I-3、Ty3、Ty4、及 Ty6 等抗病基因，而這些抗性基因正是在設施番茄品系中必須具備的關鍵基因，顯然此研究中心是一個適合我國番茄研究借鏡學習的目標。

因此本研習目的即為安排前往佛羅里達大學墨西哥灣沿岸教育及推廣中心的番茄遺傳研究室進行為期一年的合作研發，實地對於該實驗室之育種遺傳研究進程進行標竿學習及意見交流，另一方面也在此期間持續了解美國番茄產業現況，找尋我國番茄種苗外銷的潛力與機會。

過程

第一季(107/08/19-107/11/18)

1. 在計畫研提之初便已開始聯繫受訪單位的意願，而在計畫核定後，經過緊鑼密鼓的進行相關行政手續，從對方發出邀請信、依序註冊 SEVIS 系統、取得 DS-2019 文件、基於 DS-2019 的文件向美國在台辦事處(AIT)填寫 DS-160 申請 J-1 訪問學者簽證及終於得到簽發證歷時約半年。最後成功依計畫期程按照相關規定於 8/19 出發並順利於同日入境美國，隔日抵達 GCREC 後辦理報到，當日即開始訪問研習行程。而在接下來的兩個月內，完成銀行開戶、確認聯繫電話、確認住宿地點及換發駕照等生活及簽證所需相關行政手續。
2. 由於抵達實驗室時多數秋作試驗植株已經播種完成，旋即開始協助一般育苗管理、植體材料蒐集、雜交溫室盆栽準備等工作，之後更與研究室主持人、博士後研究人員、博士班學生、助理及技術人員進行萎凋病(*Fusarium wilt* 及 *Fusarium crown rot*)、TMV 及 TYLCV 接種及 2018 秋作試驗族群定植。
3. 經與研究室主持人討論後確認本年度研習範圍主要負責耐熱育種族群及高品質 RIL 族群之田間工作安排、性狀(開花期、早期產量等)調查及數據分析，耐熱族群也於第一季末期開始進入果實採收調查階段。
4. 參與主要由在 GCREC 博士班學生及博士後研究人員組成之 GCPSA (<https://gcrec.ifas.ufl.edu/gcpsa-mission-and-activities/>)，該學術組織主要活動是每兩周進行學術專題討論活動一次，由中心之學生、博士後研究人員或邀請其他專業學術人員進行專題演講以促進交流，加入後，研習人員即在 8/30 以「農業試驗所之蔬菜研究」為題進行演講，促進研究中心之研究人員認識台灣蔬菜研究進行交流。
5. 參加及協助準備佛羅里達農業博覽會(Florida Ag Expo)，11 月 8 日為佛羅里達農業博覽會，地點即在本研究中心，本博覽會之目的其中之一為促進本中心與生產者之交流，因此參與人員並非一般民眾，主要是佛州農業生產相關業者，參展的單位除了本中心外，還有農業資材等廠商。在此博覽會，除了促進學生、研究人員認識農業生產相關業界人員，同時也是個實驗室進行研究成果展示及推銷的重要機會，對本研習的實驗室來說，本次規劃的兩大重點是抗細菌性斑點病及抗黃化捲葉病毒品系之展示，因此除了事先田間進行種植準備外，在本展覽會期間，也協助田間的講解。

第二季(107/11/18-108/2/18)

1. 本季期間 2018 秋作之大部分植株陸續著果，主要研習內容包括研究室團隊進行試驗站內之秋作番茄試驗之萎凋病(*Fusarium wilt* 及 *Fusarium crown rot*)、TYLCV、TMV 及細菌性斑點病的病徵檢定以及其他如試交和商業品系、特定基因(FAS、stf)試驗之外表植株果實採收、分選及測量，以及 RIL 族群和種原保存用之種子採收。病徵評定上大致使用國際慣用之量表，黃化捲葉病毒病癥分為 0 至 4 級，細菌性斑點病則為 0-12 級，檢定時由兩名人員分別觀察植株兩側，經討論後給予該單株或該小區之等級紀錄，萎凋病的部分則是在移植前將種苗之軸根由中間頗半觀察褐化狀況，之後重新包土種植。由於佛州之番茄產業主要生產鮮食用大果停心型番茄，因此這邊參試的大部分品系皆為此類型，另外有部分羅馬型番茄，小果及非停心型番茄極少。大多數的試驗產量部分僅採收三次做為總產量，每次採收轉色期以上之果實，採收後分別依照缺陷種類(裂果、病害果、果臍過大及過多心室等)、果實周徑(S、M、L、XL)進行分選並分別秤重及計數，其中無缺陷之 M 以上等級為具商品價值之果實，實測單果平均重約為 100g，農民需求則主要為 L 以上(大約 150g)。調查之數據則分別由該試驗負責人(如博士後研究人員、博士班學生)等進行後續分析。
2. 實驗室中的常規育種族群，則是僅採用外觀評估，主要時機是等待植株已經著果完成，並在大約一半以達紅熟狀態時進行外觀評估，主要方法是由研究室主持人帶領另一名研究人員，在田間目視篩選優良單株進行選拔及標示，之後會再統一根據標示進行種子收集，在本季研習人員主要跟隨研究室主持人進行試交族群之評估，肉眼觀察各試交組合產量、果實大小、果型、裂果率等特性，並以手觸感受成熟果實之硬度，據研究室主持人表示本季整體而言植株普遍生長非常優良，植株偏大而著果量也大，是番茄生產之理想狀態。
3. 由於在申請前往本實驗室進行訪問之時，筆者表示對於耐熱育種特別有興趣，而實驗室主持人考量筆者本身之背景，亦表示希望能夠借助試驗人員的經歷，因此將實驗室之耐熱及高品質試驗 RIL 族群試驗同時交由研習人員負責，以利經驗交流及合作。在本季期間，完成耐熱育種族群開花期性狀以及 8 次之果重及產量調查，是該試驗的首次完成完整的產期調查；在高品質 RIL 族群經由多次與實驗室主持人之交流討論後，決定了該族群的調查方式，並在此期間除了完成產量、果重及糖度等調查之外，由於及時完成該族群之世代推進和數據分析才得以根據分析結果及時開始 2019 年春作試驗之播種。
4. 除了在試驗站中心的各項育種試驗外，本實驗室亦在冬作期間，在佛羅里達州南部 HomeStead 與大型生產農戶 DiMare 有合作試驗，主要是在評估本實驗室育成之抗斑萎病毒品系在當地的適應情形，前一季時已在 10/31 歷經單趟約 5 小時的車程，將試驗品系定植於該試驗田區，而在本季期間，則分別

於 1/23-25 及 2/6-7 兩次再次前往該地進行收穫分選調查。在佛州番茄商業生產的現況，因為希望果實硬度高便於儲運因此主要採收足夠大粒的綠果，而轉色期以後之果實則非收穫標的，異地採收調查對實驗室來說是大事，除了需動員相當大的人力以外，連分選之機器連同發電機皆直接運至當地進行現地使用，在當地可觀察到佛州番茄實際之生產方式，其實仍與實驗室之試驗生產方式程有不同，為此筆者請教實驗室主持人是否應將試驗之生產方式進行調整已適應商業生產模式，而實驗室主持人表示，維持採收轉色期以後之果實主因是此時比較容易觀察到各項缺陷，以更嚴苛的篩選條件進行選拔其成果應較令人信服。

5. 原本實驗室規劃 1 月前完成即可完成 2018 秋作之收穫及 2019 春作試驗族群之播種，但由於秋作試驗規模太大，又碰上冬季極少見的連續大雨，許多番茄除了果實已經懸掛在植株上過久開始腐爛之外，甚至部分田區在強風過後(附近發生龍捲風)整排植株倒伏在地上，而人力上不幸遇上政府關閉，原本會協助採收之罪犯無法前來，種種因素導致實際上之進度無法如期完成、甚至在美國人最重視之聖誕假期仍須安排人力進行果實收穫。另一方面，考量春作後期常面臨到午後陣雨的天氣型態，為了加速植株生長速度，播種後還將穴盤移入生長室催芽，數天後再搬回育苗溫室，這樣多餘的工作全部強碰在一起，秋作尾聲可以說是相當艱困，最後終於在 2 月上旬完成包含 Homestead 試驗的果實採收、自交種子採種及 2019 春作之播種。
6. 播種後，經過約一兩周的休息，待試驗族群之幼苗子葉平展之後及開始協助 109 春作重要抗病基因 (Ty1-6、I3、J2、SW5&7、Ph2.3、FCR)之分子輔助選拔，本實驗室每期作約抽取 40,000 株之 DNA，並進行約 90,000 筆之基因型判定，而這工作量必須在幼苗子葉平展後至定植(約 3-4 葉齡)的 4 周內完成。在考量成本(一個資料點大約耗費 0.25 美元)及速度(15 分鐘可判定一盤 384 孔)之下，實驗室主要採用 HRM(高精度融化)系統進行基因型之判定，而此系統為新開發之基因型別判定系統，因此也成為筆者重要之研習項目，在此段期間，筆者不僅取得各抗病基因可穩定分型之引子對資訊外，也協助約 15,000 資料點之分子輔助選拔。
7. 另外在本季期間，除持續參與 GCPAS 學術專題討論活動，聽取整個研究中心之各項研究主題成果之外，也因此得到與草莓研究部門更多交流之機會。GCREC 的主要研究除了番茄外，草莓也是本中心的重要作物之一，而由於恰逢 4 年一度的北美草莓研討會，因此在本季也剛好得到機會進行不同作物之交流研習機會，在此機會中，與 Dr. Shisuke Agehara 教授佛州、日本和台灣的草莓生產現況有許多的討論，因此受邀在該研討會中共同發表海報一張，另外在該研討會的田間參訪中，也看到許多品系對於草莓炭疽病展現抗性，由於佛州的氣候其生產模式與台灣類似，而台灣草莓生產也受到炭疽病的嚴

重壓力，或許在未來的草莓育種中可考慮從佛州引入抗病種原。

第三季(108/2/19-108/5/18)

1. 在本季期間，依計畫期程持續實際跟著研究室團隊進行試驗站內之春作番茄試驗之分子標誌檢定、定植、萎凋病(*Fusarium wilt* 及 *Fusarium crown rot*)、TYLCV、細菌性斑點病及斑點病的接種病徵檢定。由於已經有了秋作的實務經驗，在本季的研習中，除了加強對於各病徵評估之精準度及穩定度之外，更分別對各試驗族群的遺傳背景開始進行更多的探索。

由於在本實驗室中，一大研究方向即是開發新的抗性基因，因此先是篩選了許多野生種原的抗病能力，之後應用這些材料漸滲至栽培種後來探索抗病表現。經由對於這些遺傳背景的探索以及最新的病徵判定結果，在抗黃化捲葉病毒方面似乎找到一些新的抗性來源，並且含有主效抗性基因，雖然在經過初步的分析之後顯示抗性基因位點與已知的主效基因相距不遠可能是位處相同基因，但考量其來源之抗性較強且可能有較小的漸滲片段，仍有相當高的應用潛力，由於這類的資訊尚未發表，如果筆者沒有前來此實驗室進行研習參訪，可能要等待 5 至 10 年待相關試驗數據完備進行發表後才能得知。

2. 由於春作早期氣溫較低，試驗材料在定植後生長速度較慢，直到本季後期才陸續開始有果實成熟、開始進行產量、果實分級等調查。在本季期間，許多試驗植株在定植後發現明顯的生長速度不均，其原因推測為氣候及土壤過於乾燥，而砂質土壤的環境儘管使用滴灌仍無法在整個植床提供均勻且充足水分。另外一方面，在本季後期，田區植株陸續發現萎凋狀況，受害植株約佔全體 15%，部分育種材料甚至無一倖存，最後在植病部門的鑑定結果為青枯病，這是相當意外的結果，因為一般來說青枯病在砂質土壤中較不易存活，而該試驗田區為新開闢之區域，先前並無種植任何作物，且種植前也依標準作業流程進行土壤燻蒸消毒，這些顯示出露天栽培進行研究是驗仍存在著很高的風險。

筆者所負責之高品質 RIL 族群可能由於所在田區剛好較無青枯病的現象，因此試驗族群仍得以順利的進行所有單株之種子採種，但由於考量早期的生長太過不均，產量調查被迫取消。

3. 在協助抗 TYLCD 試驗期間，研習人員根據已經種植在田間的材料，提出一個新的研究主題，想要確認目前已知主效基因之連鎖累贅，經與實驗室主持人討論後，開啟了這個新的研究專案，而在本季期間，進行了帶有抗病基因 NIL 的外表性狀調查，確實發現目前已知的主效基因似乎也會連鎖影響前其生長之外表特性。而此新的研究規劃加強了本訪問期間之交流深度。

第四季(108/5/19-108/8/18)

1. 雖然春作比預期的晚播種，但天氣型態在春作試驗採收後期才逐漸轉變成夏季陣雨型態，加上青枯病蔓延，許多試驗植株死亡減少了採收的數量，2019春作反而較快速的完成所有的果實收穫、分級及調查。而在此期間，仍跟著實驗室主持人，進行了許多育種族群之田間單株選拔，也因此如何在如何聚合眾多抗性基因但保持良好園藝性狀上進行了很多意見交流及經驗傳承，根據實驗室主持人表示，如單純以回交育種法進行番茄選育，可能由於各個不同抗性基因多少帶有不同程度的連鎖累贅或彼此有不同的基因交互作用，他觀察到多數仍會改變優良自交系之園藝性狀，如何有效應用這些性狀的“改變”是番茄育種的重要關鍵。由於筆者本身亦進行設施番茄品種選育計畫，諸如此類的經驗傳承確實可以提升未來育成優良品系之成功率。
2. 由於 2019 春作觀察到田區意外的有高的青枯病害壓力，因此實驗室主持人額外規劃了一個大約 15,000 株的評估試驗，整個試驗應用兩個先前建立的 RIL 族群進行夏作青枯病評估試驗。儘管本實驗室平時已習慣大規模的試驗，但 15,000 是有史以來最大的試驗，因此自從確認導致 2019 春作植株萎凋是因為青枯病後，便陸續開始進行本試驗之播種及育苗，而定植前，為了使如此規模之試驗可以在比較接近的條件進行，因此提前兩天進行試驗田區打洞、試驗前一天進行打洞位置的病菌接種(每個洞注入約 90ml、大約 1,000,000CFU 的菌液)，定植當日實驗室全員提早抵達中心，在雨中終於完成全族群的接種與定植，至於如何執行病徵評估至離開前仍持續討論中。
3. 針對抗 TYLCD 主效基因之連鎖累贅進行探討部分，經由數據分析後意外的發現目前常用的三個主效基因中其中有兩個似乎有顯著減產的影響，而另一個有果臍過大的問題，為了確認果其過大的問題是否為其他已知基因的連鎖，持續的進行特定基因的檢定，因為該基因的分子標誌仍為電泳標誌，再現性及穩定性差，因此在此部分不斷的嘗試新的跑膠條件後，最後終於得到結論，並協助實驗室改善該分子標誌之條件。由於已近訪問尾聲，除了此新增之研究計畫之外，也將原先負責的耐熱和高品質 RIL 族群的試驗結果進行最終分析與討論，並移交給實驗室之其他研究人員。同時也進行未來持續合作的機會及方式進行討論，實驗室主持人表示未來非常歡迎進行持續的合作研究，如有機會也很期待來台灣進行參訪。

心得及建議

(1)如同本計畫提供研究人員中長期的出國訪問機會，使研究人員暫時離開原先工作領域，進行不同文化、思維及技術交流，並且就近觀察國際產業需求差異，經過沉澱及重新檢視分析，確實有助研究人員規劃未來的研究創新，並具有更宏觀的產業視野。在日益強調全球布局的設施及蔬菜產業，此類的人才培育機會如能持續提供，並讓研究人員在回國後分享經驗並實際做出及時改變，才可使我國在這瞬息萬變的產業中持續維持高度競爭力。

(2)受訪單位一旦訂立研究目標後，各領域間合作緊密，並可長久持續的進行試驗，因此團隊間願意持續投入資源進行長期投資，也因此才能在同一個研究目標持續的得到新的研究成果，建立良好的研究價值以領導佛州產業。

(3)美國生產者也注重持續的研發創新，因此生產者會將販售的所得一部份捐助生產者協會，而生產者協會將資金贊助該作物之育種研發計畫，也因此此類的育種研發計畫不僅契合產業所需，生產者與研發者的互動更加良善。

(4)美國整體社會強調價值，因此不僅是單從商品的定價、個人的研究或是研究中心的定位都是在強調自身可提供給對方服務的重要性，而非主要從成本考量，也因此開啟一個新的專案之前，溝通及概念的討論往往花費了較多的時間，相當值得未來在進行研究規劃時之借鏡。

(5)儘管研究中心的田區、機械、人力等資源相當充足且配合良好，但各試驗規模仍不是越大越好，一旦超出負荷仍然會產生各式問題降低試驗成效，因此在未來的育種工作規畫安排仍須注意各資源間協調的狀況，才能發揮最佳的成效。

附錄



圖一、佛羅里達大學墨西哥灣沿岸教育及推廣中心(GCREC, UF/IFAS)主建築物，此中心位於佛羅里達州中部，主要研究作物為番茄、草莓及一些替代和景觀作物。



圖二、實驗室平時開會狀況，右側為蕃茄遺傳研究室主持人 Dr. Samuel F. Hutton，中間站立者為前研究室主持人 Dr. John W. Scott。



圖三、育苗溫室為浪板單斜四連棟溫室、側邊無防蟲網、每日人工澆水、每周以藥劑進行病蟲害防治及施肥。



圖四、試驗番茄種質包含大量野生種、外觀多樣。



圖五、黃化捲葉病毒接種方式採用粉蝨接種，在生長室內以盆栽番茄保持帶源粉蝨族群，穴盤苗放置於帶源植株旁兩日後移出。



圖六、苗期自子葉開展即開始進行大量的抗性基因分子標誌鑑定，春、秋作每期約篩選五萬株。



圖七、實驗室自 2016 年後主要轉成以 HRM 系統進行分子標誌鑑定，此系統具有快速、設計彈性大及成本較低等優勢。



圖八、除了以分子標誌鑑定已知抗性基因、同時仍採用傳統病徵篩選選拔抗性植株，圖上為接種萎凋病後呈現抗性、圖下則為感性(維管束褐化)。



圖九、經篩選後的植株定植於田間，田間已由機械預先完成塑膠布、滴灌管鋪設及植床薰蒸，定植前以凸輪進行打洞及肥料或接種液灌注。



圖十、2019 春作定植期間由於氣候乾燥，砂質土滲水速度過快，滴灌後植床水量仍不足需額外補注。



圖十一、佛州番茄主要以停心型番茄為主、大多為立柱栽培，由於田間範圍廣大因此使用大量噴漆協助定位。



圖十二、番茄黃化捲葉病毒接種試驗田，可明顯觀察到個抗性基因的抗性表現，圖中人物右為主校抗性基因(Ty3)，左前為微校抗性基因(Ty6)、前為感性植株。



圖十三、部分學生開始採用移動裝置在病徵檢定時進行資料輸入。



圖十四、田間進行外觀園藝性狀單株選拔。



圖十五、番茄採收仍以傳統人工方式進行，採收已達轉色期之果實，多數試驗全期間採收 3 次，採收後以果實周徑進行分級(S、M、L、XL)並記錄總重及果數，M 以上為具有商品價值之大小(約 100g)、分級時同時進行缺陷果之缺陷原因判定。



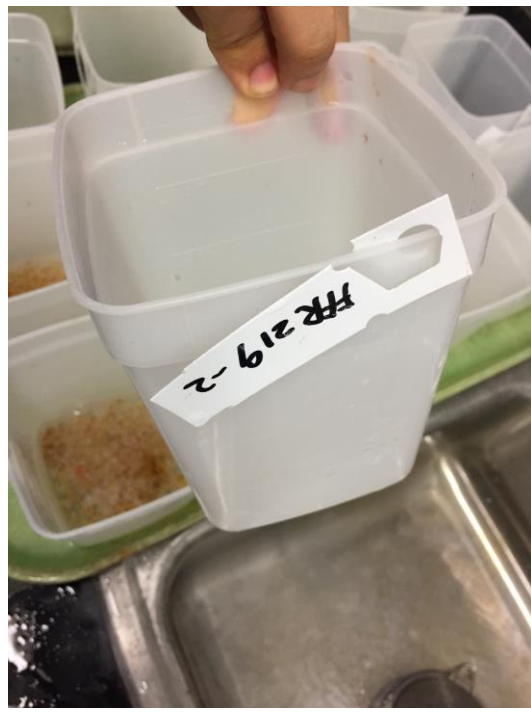
圖十六、位於佛州南方(Homestead)之商業生產田進行試驗，在商業模式之下僅收獲轉色期以前夠大之綠色果實，之後統一進行催熟販售，轉色期以後之果實並非採收標的。



圖十七、除了田間試驗，多數雜交使用之植株會另外以 5 加侖種植袋內含介質種於具有風扇水牆之玻璃溫室，每期作進行約 200 雜交組合。



圖十八、優選植株之果實採收後因數量龐大，多數以機械進行破碎洗種。



圖十九、初步洗完之種子以鹽酸去除種子外之果膠，標籤形狀特殊適合掛於植株上。



圖二十、栽培後田間噴施巴拉刈、去除覆蓋之塑膠布及固定用之塑膠繩，之後直接於田間焚燒、木頭立柱則回收再使用。



圖二十一、露天田區仍有許多栽培不良的狀況，2019 春作在定植初期試驗植株明顯的生長不均。



圖二十二、部分植株可能因植株較高、果實量大，在強降雨或強風後整排倒塌，造成選拔及採收困難。