

出國報告 (研究)

研習全基因體定序技術-以番茄髓壞疽細菌 *Pseudomonas viridiflava* 為例

服務機關：農業試驗所

姓名職稱：蔡佳欣

派赴國家 /地區：加拿大安大略省圭爾夫大學

出國期間：108.4.24- 108.10.20

報告日期：109 年 1 月 16 日

目次

摘要.....	1
出國目的.....	1
研習過程.....	1
心得與建議事項.....	2
研習活動照片.....	3

摘要

Pseudomonas viridiflava 為世界上重要的植物病原細菌，寄主範圍廣，分布在世界各地，可危害多種作物。近年國內已陸續發現此菌造成番茄髓壞疽病、胡瓜細菌性白枯病及十字花科蔬菜細菌性葉枯病，為了瞭解來自不同寄主之病菌遺傳變異性，收集了來自不同寄主的 *P. viridiflava* 分離株，利用次世代定序以及組裝軟體（包括 Abyss，SOAPdenovo 和 Velvet）組裝定序數據。所組裝的序列數據使用 RAST（Rapid Annotations using Subsystems Technology）預測組裝序列的基因。為了了解台灣分離株的變異性，從所組裝的基因中提取了三個管家基因 *gyrB*，*rpoB* 和 *rpoD* 的部分序列用於 multilocus locus analysis 分析（MLSA）。發現來自台灣不同寄主的 *P. viridiflava* 在系統發育分析中可分為三個進化支，顯示各分離株變異性高。

出國目的

隨著次世代定序技術(next-generation sequencing technology, NGS)發展越來越成熟，定序成本大幅降低，已達一般實驗室可負擔範圍，應用層面越來越廣，利用此技術獲得生物全基因體，已廣泛應用在醫學診斷等方面，本次出國乃為研習次世代定序以及基因組裝分析技術。利用該技術可獲得大量基因的特性，再通過多基因序列比對用於鑑定該病原細菌以及分析不同寄主來源及地區的病菌分離株之間基因體的差異，用以解決部分病原細菌在傳統生理生化特性具有變異或是相似菌種不易鑑定的問題，強化病菌的鑑定技術及檢測技術。

研習過程

本計畫提供研究人員短期 6 個月出國研習新技術的機會，對目前研究工作中遭遇的困難，藉由新技術的引進獲得解決，增進研究人員的研究量能，進一步有效的解決產業上的問題。本次出國研習為前往加拿大圭爾夫大學環境科學系進行為期 6 個月之植物病原細菌次世代定序與組裝分析技術研習，大幅增進研究人員對植物病原細菌的鑑定與分析能力。該技術由加拿大圭爾夫大學環境科學系 Tom Hsiang 教授指導。主要的研習活動可分為以下 5 部分

(1) 次世代定序技術研習

由圭爾夫大學環境科學系 Prof. Tom Hsiang 解說次世代定序技術原理，本次研習的定序策略採用 Illumina, HiSeq X Ten 系統，雙端定序(pair-end)方式，可獲得低成本、高通量及高準確度的定序結果。次世代定序菌株核酸為來自台灣不同寄主來源之 *P. viridiflava* 病菌，包括十字花科、茄科、葫蘆科共 8 株。並從國外引進 *P. viridiflava* 之對照菌株 2 株。相近菌株 *P. mediterranea* 1 株，*P. corrugate* 1 株。將上述菌株進行核酸抽取，進行電泳分析後，確認抽取到病菌核酸之後，將核酸交由加拿大定序公司進行次世代定序。

(2)基因組裝技術:

學習次世代定

序原理以及定序後之序列格式後,將送交次世代定序所獲得的 12 株病原菌原始 DNA 短片段序列,利用加拿大圭爾夫大學實驗室的 ubuntu 伺服器進行基因組裝。基因組裝學習使用 3 種軟體 abyss, soap,及 velvet 以及 Linux 命令、參數設定等進行組裝,並比較 3 種軟體的組裝結果,以獲得較佳的基因組裝序列。

(3)基因預測

組裝後基因以 N50 比較不同條件下全基因組裝結果,選取最佳的組裝 DNA 序列結果,以 RAST(Rapid Annotation using Subsystem Technology)可將所組裝的全基因組 DNA 序列進行基因預測,可得約 5000 個基因,並將全部基因進行功能注釋。

(4) 菌株系統發育關係分析(phylogenetic analysis):

為分析不同菌株的核酸差異性,學習系統發育分析理論與技術,從所組裝的基因中可以比對出細菌管家基因 gyrB, rpoB 及 rpoD,將 3 組基因部分序列擷取出進行 multilocus sequence analysis(MLSA)分析,系統樹由 MEGA X 軟體,以 neighbor-joining, bootstrap 1000 方式建立系統樹,結果發現,台灣的菌株可被區分為 3 個 clades,顯示該種菌株具有高度的變異性,並且大多數台灣菌株相較於國外菌株 pv DSM11124 與 pvDSM6694 屬於不同 clade。

(5)其他交流與合作

A.本次研習之圭爾夫大學為國際型大學,該校定期開辦各類英文短期課程供該校國際學生增進口語溝通及研究寫作,該類課程免費開放給訪問學者參加,對研究人員持續改善英文口音、溝通及論文寫作等英文能力極有助益。

B.本次除了研習次世代定序技術外,亦參與該實驗室的研究計畫討論、參訪當地主要糧食作物小麥之育種田間試驗(Wheat breeding program),藉由與當地學者及研究生交流,了解當地主要小麥作物的主要病害及研究趨勢等資訊。

C.由於本次參訪之圭爾夫大學以加拿大農業研究著名,在本次參訪期間恰逢一年一度的加拿大植物年會(Plant Canada 2019 conference)在該校舉辦,除了參與該研討會的研究討論外,該研討會亦提供的植物病理田間觀摩,在田間參訪期間與加拿大農友討論當地主要作物如蘋果、桃、草莓、玉米等病害問題,獲得加拿大農業研究方向與產業資訊。

心得與建議事項

- (1) 此短期出國研究計畫,提供研究人員研習新技術,協助解決目前的研究問題,擴展領域視野,提升我國研究人員研究量能,值得續辦。
- (2) 本次學習次世代定序與組裝技術,該組裝技術以 Linux ubuntu 命令以及腳本(script)執行,非傳統的 windows 介面,必須長時間的投入與練習命令列,並了解其命令邏輯,方能熟悉,該技術目前在台灣大多應用在人

體醫學研究，植物病理研究應用還不多，隨著技術成熟成本下降，非常值得投入學習並應用。

- (3) 由本次次世代定序與組裝技術研習結果可知，細菌核酸在次世代定序後，所得 DNA 短序列片段經由電腦運算組裝，可直接得到細菌近乎全基因組序列，取代過去傳統需進行短序列基因 clone 的流程，節省大量時間與人力，該技術高通量的特性，將逐漸為各研究領域應用。
- (4) 本次研習經由 Prof. Hsiang 定期的教導 phylogenetic 技術，用以分析病菌的分群，對研究人員往後的研究工作具有重大助益，亦為本次研習的收穫。

(5) 攜回資料名稱及內容：

ubuntu 作業系統、細菌組裝命令及參數資料、細菌 DNA 組裝完成序列

研習活動照片



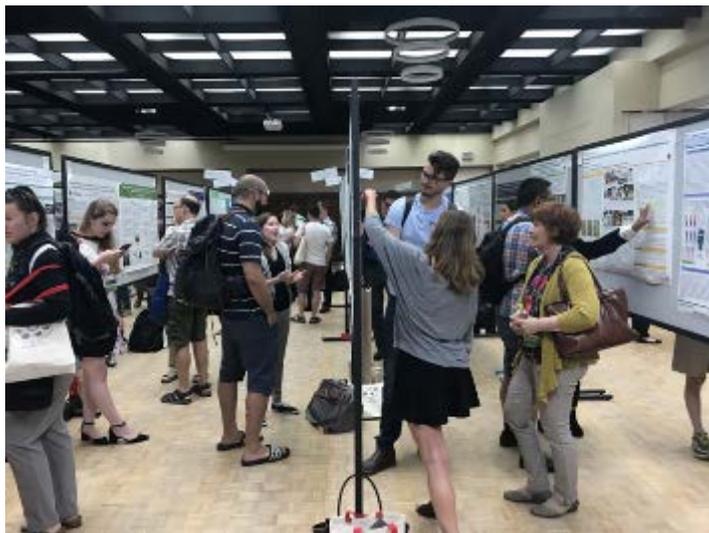
研習地點:加拿大圭爾夫大學(University of Guelph)



參加圭爾夫大學開辦給該校國際學生之英文課程，增進英文能力。



參訪小麥育種試驗田，與教授及研究生討論田間試驗



參加 Plant Canada 2019 研討會與當地學者交流討論