

出國報告(出國類別：進修)

農委會農業菁英培訓計畫- 薊馬及其媒介病害之管理策略

服務機關：行政院農業委員會農業試驗所

姓名職稱：陳怡如助理研究員

派赴國家/地區：美國/喬治亞州

出國期間：107年4月9日至111年4月8日

報告日期：111年7月4日

摘要

薊馬是重要農業害蟲及病害媒介昆蟲，本研究目的為透過薊馬與其媒介病毒病害之間的關係，協助花生抗病育種篩選減緩病害發生。研究過程中，評估田間條件下接種源隨時間影響薊馬獲毒和接種的變化，以及最佳化即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (real-time RT-qPCR) 病毒檢測技術，結果顯示接種源中病毒具有季節性變化，少量的薊馬仍可造成病害二次傳播。因為野生花生(*Arachis spp*) 為潛力抗病蟲來源，本研究利用薊馬傳毒及評估病毒累積量及薊馬取食危害程度，篩選出具抗/耐性野生花生基因型，結果顯示薊馬抗/耐性可能來自抗生現象。為了解野生花生抗/耐病反應，利用次世代定序之RNA-seq所得片段組成轉錄體，比較具抗性野生花生罹病前後之基因表現量及功能，以更進一步討論其差異。

目錄

壹、	研究目的及主題.....	4
貳、	研究過程.....	4
參、	研究成果及應用.....	6
肆、	進修心得.....	11
伍、	建議事項.....	12

壹、 研究目的及主題

因應國家強化農業人才培訓，本員承蒙農委會農業菁英培訓計畫補助至美國喬治亞大學攻讀博士學位，以汲取先進國家之病蟲害防治經驗。蟲媒病害在台灣逐年發生，造成嚴重作物損失。媒介昆蟲在病害的傳播扮演著重要角色，因此透過研究媒介昆蟲與其傳播病害之間的關係，協助作物抗病育種篩選，發展管理策略以減緩病害發生。在博士進修期間，以煙草花薊馬 (*Frankliniella fusca*, tobacco thrips) 傳播之番茄斑點萎凋病毒 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV，以下簡稱 TSWV) 為研究主題，探討媒介薊馬與在落花生屬 (*Arachis*) 寄主作物及病毒的交互關係。美國喬治亞當地成功利用抗性作物及各種綜合害蟲管理策略防治得宜，此次進修除可汲取相關防治經驗，亦進一步探討其田間流行病學及野生型花在該病害的應用潛力。主要研究主題如下：

1. 在田間條件下TSWV接種源隨時間變化調控薊馬獲毒和接種
2. 評估野生花生基因型對薊馬及其傳播TSWV的抗性
3. 野生花生基因型受TSWV感染所誘導的轉錄反應

貳、 研究過程

從計畫核定至返國歷時五年，規定計畫核定一年內需取得入學許可並啟程，四年公假出國期間共獲三年計畫補助及因武漢肺炎疫情(Covid 19)影響之四個月靜止期生活費。出國進修者是以取得學位為目標，因此博士學程除研究論文外，因需修課取得學分或實習授課以符合畢業要求，均妥善安排分配研究時間及課程。由本研究計畫執行時間軸(圖一)顯示修課約一年，因所屬研究室位於喬治亞大學 Griffin 校區，並非 Athens 主校區，其中兩學期需住在主校區上實體課，而無法進研究室。此外，花生為一年一作，每年 5 月至 10 月需前往 Tifton 校區（花生產區）採集病蟲害樣本，爰此獲得寶貴田間經驗以了解美國大規模作物之病蟲害相及其管理。



圖一、農業菁英計畫時間軸

表一、執行計畫分年度目標與進程

計畫年度	分年度目標
107	<ul style="list-style-type: none"> ○ 完成出國手續、學校申請手續、行前準備及註冊 ○ 完成博士學位第一年夏季及秋季課程
108	<ul style="list-style-type: none"> ○ 完成博士學位第一年春季課程 ○ 完成博士學位第二年夏季、秋季課程 ○ 專題討論蠶翅目薊馬分類研究 ○ 薊馬傳播及病毒檢測技術
109	<ul style="list-style-type: none"> ○ 完成博士學位第二年春季課程 ○ 完成博士學位第三年夏季、秋季課程 ○ 完成以薊馬傳毒效率評估抗性寄主之研究
110	<ul style="list-style-type: none"> ○ 完成進修博士學位第三年春季課程。 ○ 共同撰寫薊馬及其媒介病害管理策略相關文章 ○ 完成 TSWV 田間接種源隨時間變化之傳毒試驗 ○ 野生花生RNA轉錄體定序 ○ 取得博士候選人資格
111	<ul style="list-style-type: none"> ○ 完成野生花生RNA轉錄體資訊組裝及資料分析 ○ 撰寫論文及完成博士論文口試

參、 研究成果及應用

1. 在田間條件下TSWV接種源隨時間變化調控薊馬獲毒和接種

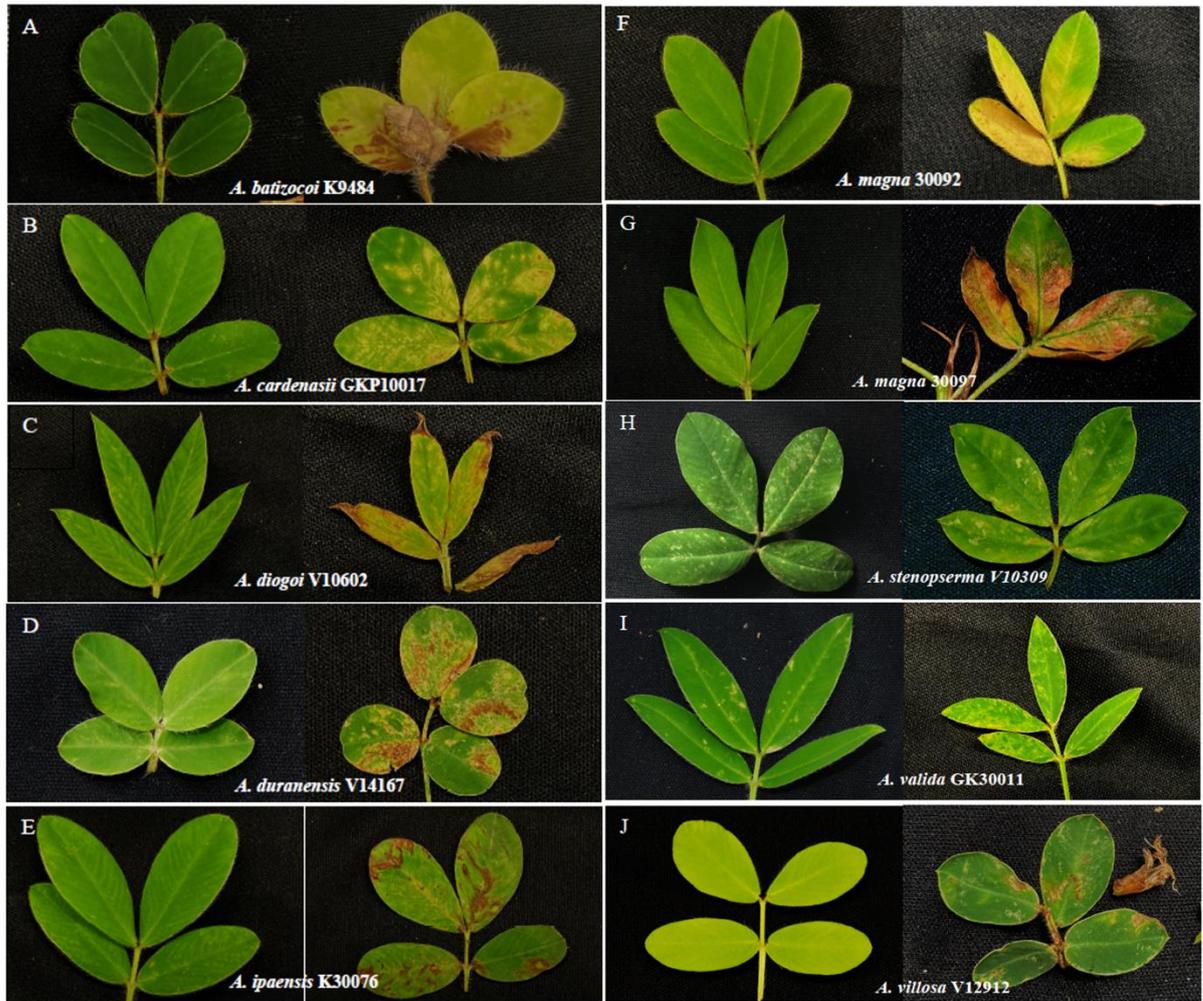
煙草花薊馬是美國東南部花生中 TSWV 的主要傳播媒介，TSWV 導致花生斑點萎凋病可能嚴重限縮花生產量 (圖二)。先前的研究顯示，TSWV 的二次傳播可發生於全產季。煙草花薊馬從田間 (作物) 接種源獲得 TSWV，並接種花生 (*Arachis hypogaea* L.) 造成二次傳播，而病毒與花生植株的交互關係決定了二次傳播的程度。本研究依據 TSWV 在花生中的積累量得知 TSWV 傳播能力隨時間變化，種植季節後期的田間接種源會影響帶毒薊馬比率。結果顯示薊馬在產季後期傳毒能力有限，但仍可造成田間病害的二次發生。另，病毒接種源及薊馬對 TSWV 的獲毒和接種隨時間遞減，彼此具有正相關。為偵測帶有 TSWV 的薊馬比例，研究以即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (real-time RT-qPCR，以下簡稱 RT-qPCR) 檢測單隻薊馬體中 TSWV，此技術已最佳化並適用於辨別在黃色黏板上的薊馬樣本，有利評估 TSWV 在生產季節 (二次傳播) 和非作物季節 (一次傳播) 的病害傳播。



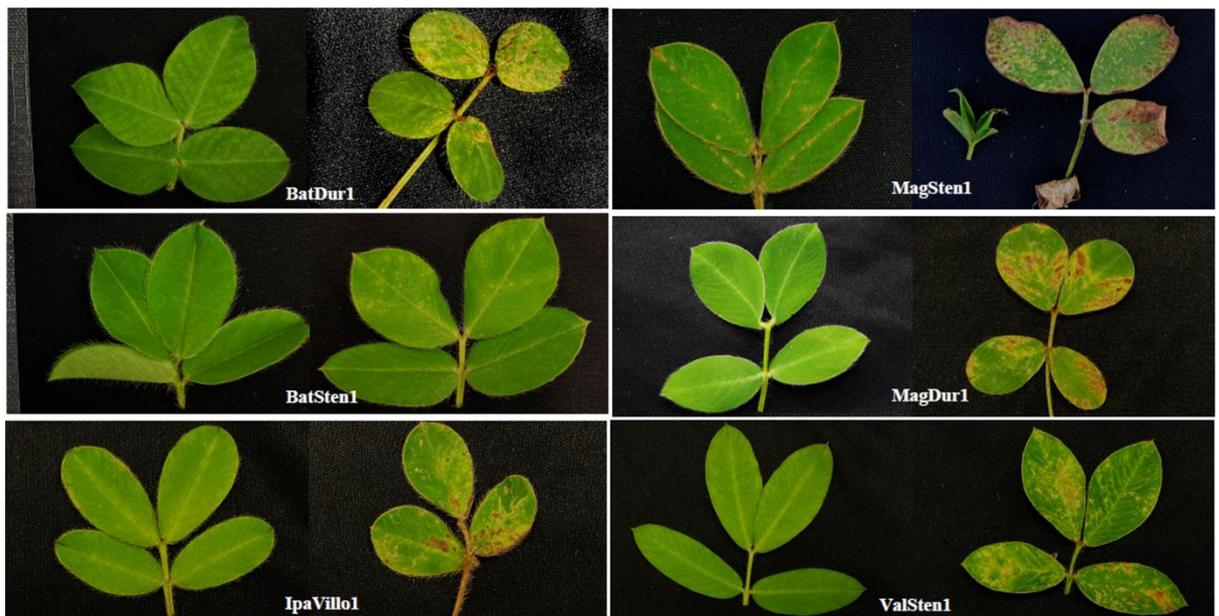
圖二、煙草花薊馬成蟲。(左：雌蟲；右：雄蟲)

2. 評估野生花生基因型對薊馬及其馬傳播TSWV的抗性

薊馬以持續增殖方式傳播番茄斑點萎凋病。花生中的TSWV感染會導致限制產量的花生斑點萎凋病，過去三十年來，美國花生育種計畫一直致力於開發抗薊馬和/或TSWV的栽培品種。然而栽培花生可用之遺傳抗性來源有限，野生花生基因型是抵抗害蟲和病原體的重要來源。隨著技術的進步，目前已可從落花生屬野生二倍體 (*Arachis* spp, AA、BB和KK亞基因組) 導入抗性基因至栽培用異源四倍體花生 (*Arachis hypogaea* L., AABB基因組)。為擴大花生抗病及抗蟲之篩選基因庫，本研究以野生花生品種為材料，利用薊馬傳毒評估10個野生 *Arachis* 和6個誘導的異源四倍體基因對薊馬和TSWV的抗性/耐受性 (圖二及圖三)。經RNA萃取並定量評估病毒野生花生罹病程度，在薊馬取食試驗和薊馬傳播試驗中，分別以TSWV感染率、病毒量和薊馬取食痕跡隨時間之危害程度三個參數來篩選抗性。結果顯示不同野生種花生對薊馬發育和產卵率之影響具差異，薊馬在誘導四倍體花生葉上的生物表現與栽培種四倍體花生相似，薊馬在二倍體花生所需發育時間較長且產卵量降低，因此認為二倍體花生對薊馬的抗性/耐性的機制可能來自抗生現象 (antibiosis)。此外，較低TSWV感染率和/或較低的病毒累積量被視為TSWV的抗性表現，以二倍體 *Arachis stenosperma* V10309 和誘導的異源四倍體 ValSten1 具最低TSWV感染率。異源四倍體 BatDur1 以及二倍體 *A. batizocoi* K9484 和 *A. duranensis* V14167 在試驗三週內表現出對薊馬的抗性。



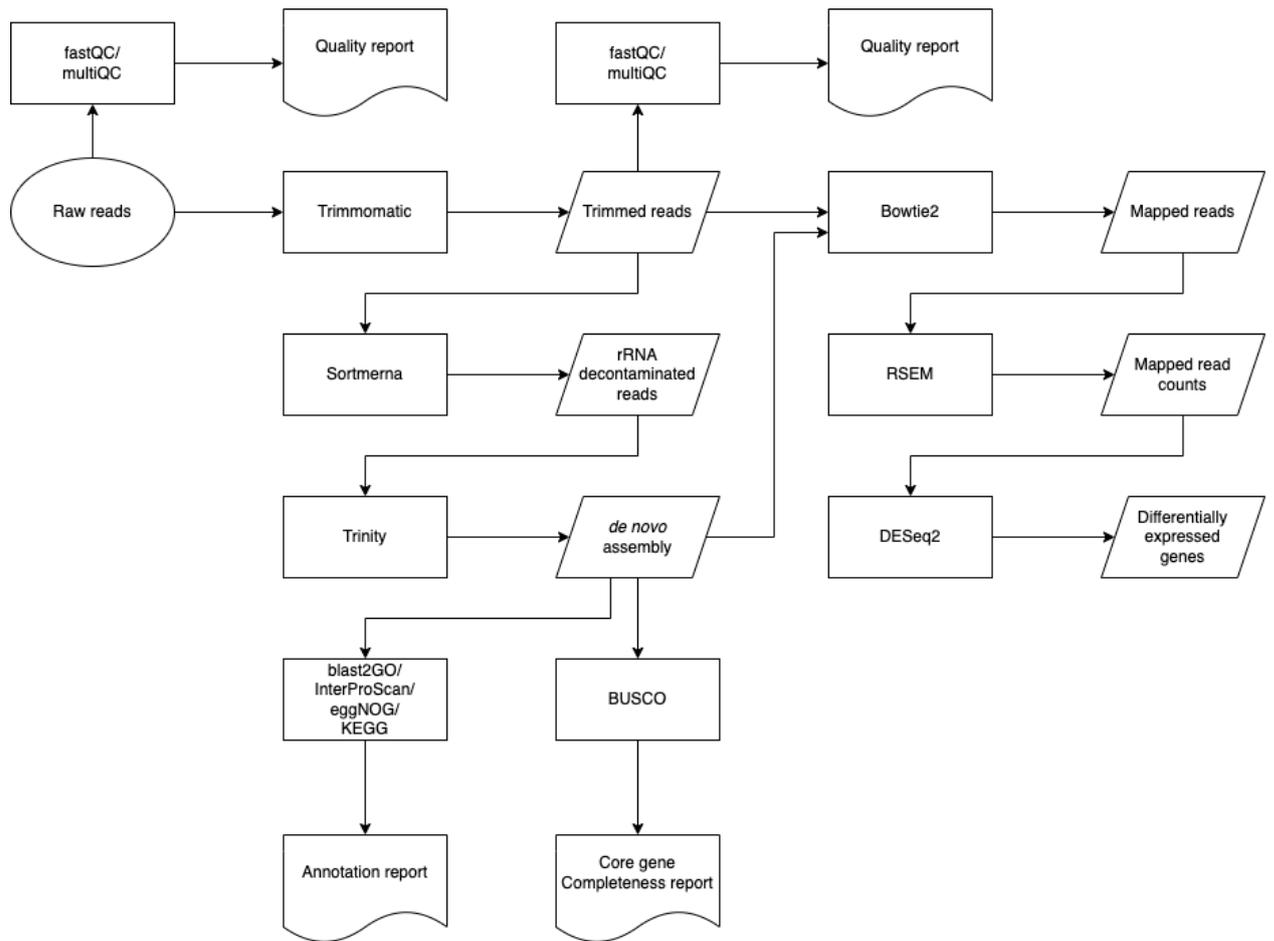
圖三、二倍體之野生花生基因型之病徵。(右：未染病：左：受病毒感染)



圖四、誘導四倍體之野生花生基因型之病徵。(右：未染病：左：受病毒感染)

3. 野生花生基因型受 TSWV 感染所誘導的轉錄反應

使用具田間抗性的花生栽培品種對 TSWV 的管理至關重要。所測試的野生花生對 TSWV 並無完全抗性。利用與二倍體物種雜交獲得的異源四倍體有助於拓展抗病蟲基因來源。為深入瞭解野生型花生抗病反應，本研究利用次世代定序 (RNA-seq) 所得片段組成之轉錄體，量測不同基因表現量及探討相關機制。利用篩選所得具抗病潛力的兩個二倍體及其異源四倍體野生花生為材料，分別定序具有 AA、BB 和 AABB 基因組的 *A. stenosperma* V10309、*A. valida* KG30011 和 ValSten1 的 TSWV 感染和未感染樣本 RNA，組裝轉錄體 (圖五) 以利評估 TSWV 感染後的差異表達基因 (DEGs，以下簡稱 DEGs) 表現量。在 *A. stenosperma*、*A. valida* 和 ValSten1 分別有 608 個、10396 個和 1475 個重要的 DEGs。*A. stenosperma* 和 ValSten1 具較高比例的負調控 DEGs，而在 *A. valida* 中則有最多正調控 DEGs。基因功能性分析結果顯示，*A. valida* 具有較多與植物防禦相關的 DEGs，其次是 ValSten1 和 *A. stenosperma*。此外，*A. valida* 亦有較多有關於植物植物賀爾蒙和光合作用的 DEGs，其次是 ValSten1 和 *A. stenosperma*，但均以負調控為主。總之，由轉錄體量測對 TSWV 感染的基因表現顯示，具有 BB 基因組的 *A. Valida* 染病後似乎比具有 AA 基因組的 *A. stenosperma* 中具有較多基因表現。相較來源二倍體 *A. valida*，從二倍體誘導所得之異源四倍體 ValSten1 對 TSWV 感染的反應基因表現較低，抗性遺傳減弱。



圖五、序列組裝基因比對及差異表現基因(DEGs)流程圖。

4. 成果應用

薊馬體小、善躲匿、繁殖快、不易防治，可媒介病毒病害。有關薊馬及蟲媒病害管理需要專家團隊以構思跨領域管理策略。了解薊馬及病毒之交互關係有助於減緩病毒疫情擴散及擬定管理策略，如：避開發病環境、接種源及栽培季節。本研究標準化單隻薊馬RNA萃取技術及定量PCR病毒檢測技術，有利於了解其田間流行病學。國內並無以RT-qPCR偵測媒介薊馬帶毒率及傳播效率的資料，本技術未來亦可運用於黏板蟲樣或其他新興蟲媒病害監測。

薊馬不易大量飼養，進修過程學習以穩定的媒介昆蟲傳毒技術可作為探討作物抗病的工具，並且利用該薊馬傳毒技術加速野生花生基因型抗病抗蟲品系篩選。此外，學到應用新穎次世代定序(RNA-seq)探討抗性作物對於病害感染所誘導的轉錄反應，找出可能相關基因及機轉。

研究期間深感支援研究勞務人力不足且不易取得，國內應更珍惜人力資源。研究過程承蒙花生育種者及基因體專家病毒專家指導，以及生物資訊專家協助，方能完成該計畫。期待未來能持續與國際學者合作，找到對的人加入跨領域研究團隊。

肆、 進修心得

美國留學經驗對於工作職涯發展或個人成長都是相當有助益。公務員在外留學的主要身份是學生，修課拿學分相當耗時但讓人收穫良多。建議短期進修者也可選擇參加學短期學程或受訓，進修者則需妥善安排修課時間或考慮免修課之國家。建議出國者保持開放的心胸接受不同文化及身分的轉變，在非母語環境中保持正向及隨時調整心態是很重要的。以下羅列自身對於美國高等教育之看法：

1. **紮實進修課程**：在國外修課除需克服語言障礙，研究所課程內容強度及實習

- 有較高的要求，建議修課前仔細研讀課程研究大綱(syllabus)，評估每學期所能負荷之學分數。
2. **重視校園環境安全及學生學習權利:** 學校重視(value)每個學生，校內學習資源豐富，教學助理(Teaching Assistant)制度及評核制度完備，建議應善用每堂課提供之課後輔導 (office hour)。
 3. **學院運作完善:** 各學院內學術運作分工清楚，學者 (Faculty)分為教學型 (teaching)、推廣型(extension)與研究型(research)，其學術任務導向明確有助於學院整體發展。建議出發前應了解自身指導教授的屬性。
 4. **學校與產業連結強：**校內因應產業需求規劃多種學程 (program)，產業也提供相對的獎助學金提供學生申請，多數學生職涯規劃明確、學習動機強。
 5. **學術研究經費競爭：**教授申請經費來源方式與國內相近，主要經費仍來自科學團體 (National Science Foundation, NSF) 及政府相關部門 (The United States Department of Agriculture) 計畫 (grant)，來自民間團體經費雖少但不無小補。部分教授須執行多項子計畫及參與院內合作計畫，以維持研究室運作。。

伍、 建議事項

1. **國外媒介薊馬及其病害防治策略：**國內媒介薊馬及其傳播病害管理方式注重防治媒介薊馬及剷除病株。美國地大作物相單純少見設施栽培，多以大型機械從事露天噴藥、澆灌及採收，常以粗放且節約人力成本的概念處理問題。美國蟲媒病害管理策略側重抗病育種及探討區域性的流行病學。國內病蟲害相複雜，雖不像國外需那麼依賴抗性作物，但強化抗病育種可減少農藥使用有利永續農業。有關未來抗病植物在蟲媒病害管理應用，建議參用花生蟲媒病害風險管理 (Peanut Rx, <https://peanuts.caes.uga.edu/extension/peanut-rx.html>)或建立相似系統。

2. **國內農業推廣體系:** 美國農業推廣系統相當穩定健全，州立大學之推廣教授林立，各縣郡均有設置農業推廣代理人(county agent) 協助橋接學術與田間應用，包含監測病蟲害以及推播農業知識。印象很深的一件事是大學推廣教授撰寫推廣文章時，文末常加註一句請聯絡當地農業推廣代理人。爰此，國內需要有與國外農業推廣代理人類似的角色，也許我們已經有類似的農業推手/指導員，仍期待政府能更重視該角色，方能發展應用研究成果。
3. **強化研究人員溝通技巧:** 美國是相當注重學術溝通的能力的國家，認為研究學者除了撰寫學術期刊論文外，也需學習對不同讀者群給予不同撰稿或演講。然而無論國內外，研究人員普遍缺乏將專業艱深的紙本知識以簡要正確方式呈現給一般大眾及媒體。有效的溝通是團隊合作的基石，也才能將開發之農業新知有效傳達及應用，因此農業資深人士的溝通經驗值得被重視與傳承。
4. **維持國際研討會參與度:** 虛擬(線上)研討會(virtual conference) 可減少疫情傳播外，也讓參與者保有時間和空間彈性，可重複觀看會議，節省場地成本交通旅宿費以及註冊費，因此虛擬研討會為學術界不可逆的趨勢。然而，2021年起在美舉辦之昆蟲相關國際研討會並非全面線上，仍採混合方式。實體研討會是學者尋求合作夥伴以及媒合工作的重要舞台，虛擬研討會相對缺乏交流機會，建請政府持續支持實體參與重要會議或國際研討會。
5. **保障因公出國人員之健康安全:** 疫情爆發初期，同研究室由巴基斯坦政府補助之短期訪美學者考量疫情，毅然向該國提出擬提前兩個月結束受訓，從開始溝通至搭機離美僅需數日，巴國政府對於人員危機處理的彈性令人讚賞。反觀美國政府對疫情處理的策略並非全國統一且各州迥異，在當時引起許多爭議，大學為降低學生受感染風險以維護其健康，限制學生出入及暫停研究數月。此次疫情對全球衝擊大且長遠，然而這段日子帶給我的深刻感受為進修研究固然重要，但人身健康安全更需要被重視，同時感謝政府因疫情影響給予延長計畫補助。