

出國報告（出國類別：進修）

# 農業菁英培訓計畫-探討控制乙烯調 控型園產品採後品質之基因網路

服務機關：農業部農業試驗所

姓名職稱：鍾淨惠 助理研究員

派赴國家/地區：法國

出國期間：108年9月1日至112年8月31日

報告日期：112年10月16日

## 摘要

本計畫為執行農業菁英培訓計畫之進修項目，於法國巴黎薩克雷大學進修博士學位，試驗工作於該校所屬之Institute of Plant Sciences-Paris-Saclay (IPS2)進行。研究主題為探勘受乙烯調控之園產品性狀之基因調控機制，因接待之研究室已建立瓜類之良好研究材料與系統，因此以甜瓜為研究對象進行博士論文研究。進修期間以研究主題為導向，學習完成計畫所需之遺傳育種及功能性基因體學各項知識與試驗技術。

博士論文以乙烯調控相關基因為研究對象，針對目標性狀採取兩種不同策略探勘調控目標性狀之基因，第一種策略為利用反向遺傳學研究方法，第二種策略則是採取正向遺傳學研究法。前者使用之工具為定向誘導基因組局部突變技術，以乙烯生合成或反應基因為候選基因，於突變族群內篩選於候選基因發生突變之家系，並透過外表型鑑定確認突變對偶基因是否造成目標性狀的改變。已鑑定出一個可改變目標性狀之對偶基因，並針對突變株完成外表型鑑定，此基因同時參與生長素與乙烯的生合成路徑，並確認突變株之乙烯反應發生改變。正向遺傳學策略以分群分析法搭配次世代定序進行基因定位，再根據兩群之序列比對鎖定一段與目標性狀連鎖之染色體區間。藉由重組植株之基因型與外表型鑑定結果，目前已將候選區間縮小至302KB，並透過RNA-seq及即時定量反轉錄聚合酶連鎖反應將候選基因由8個基因座縮小2個，後續將以此兩基因為標的進行基因功能驗證。

# 目次

目的.....	4
研究過程.....	5
研究成果.....	8
心得及建議.....	10

## 目的

乙烯為植物荷爾蒙的一種，廣泛參與植物體內各項生理作用，包括發芽、生長、花朵發育、葉片與花朵老化、器官脫落及果實後熟等。植物的乙烯反應與乙烯生合成與感知有關，這些生理生化途徑皆有多個基因涉及其中，透過對基因調控機制的了解可幫助我們更好的進行性狀調控。因乙烯為參與植物老化的重要荷爾蒙，與園產品採後品質息息相關。

定向誘導基因組局部突變技術 (Targeting Induced Local Lesions In Genomes, TILLING) 為一種高通量的反向遺傳學研究方法，可從突變族群中分離出於目標基因座有突變的個體，為加速傳統誘變育種的重要工具。Dr. Abdelhafid Bendahmane的研究團隊在針對乙烯調控的性狀上有優良的研究成果，並已建立數個突變庫材料及高效的TILLING篩選平台，因此本進修計畫目標為學習TILLING的技術與流程架構，及後續之功能驗證方法，期望未來可將相關技術應用於功能性基因研究與育種應用。

此外，亦針對同一目標性狀以分群分析法(Bulked Segregant Analysis, BSA)尋找調控基因，分群分析法是針對控制目標性狀的基因進行定位的方法，具有適用範圍廣、試驗成本較低等優勢。透過實際應用操作深化相關之遺傳育種知識，學習操作流程與分析方法，未來可實際應用於基因定位與育種計畫。

## 研究過程

本計畫原定期程為108年9月1日至111年8月31日，受COVID-19疫情影響，延至112年8月31日結束，共四年。進修期間於Institute of Plant Sciences-Paris-Saclay執行計畫之各項試驗工作。各年度工作摘要如下：

- 108年
  1. 相關入學手續辦理與準備：完成學生簽證申請與巴黎薩克雷大學2019-2010年註冊手續。
  2. 學習TILLING操作技術：理論知識、樣品混合設計、引物設計、Nested PCR、次世代定序與結果分析。
  
- 109年
  1. 選擇TILLING之目標基因：根據研究團隊過往之RNA-Seq資料篩選可能與目標性狀相關之基因作為後續探勘對象。今年度選定11個基因進行後續篩選，選定之基因為參與乙烯調控之基因，一類為直接參與乙烯反應路徑之基因，另一類則是間接參與植物體乙烯反應路徑。
  2. TILLING篩選：針對上述擇定之基因進行篩選，本年度共計篩選出193個突變，並透過預測分析從中選取可能影響蛋白質功能之突變進行後續試驗。
  3. 課程研習：
    - Research integrity in scientific professions
    - Writing a scientific paper
  
- 110年
  1. TILLING突變家系之外表型鑑定：因試驗空間限制，僅能選取部分突變

進行外表行鑑定，故根據預測分析結果自前一年度篩選之突變中選取部分進行外表行鑑定。保存之突變家系種原為M2世代，基因型皆為異結合，故先推進至M3世代。M3世代經基因型鑑定後選取同結合野生型、異結合、同結合突變對偶基因進行外表型鑑定。

2. 雙突變雜交材料建立：為了解目標性狀是否受不同荷爾蒙交互作用影響，因此將表現目標性狀的突變家系與研究團隊先前已確認之其他荷爾蒙突變體進行雜交，透過雜交後代的外表型判斷是否存在交互作用。
3. 定位族群之F2外表型鑑定：親本為帶有目標性狀與不具目標性狀的兩個種原，兩親本雜交後推進至F2世代。於F2世代進行外表型鑑定，F2世代分離比符合3:1，顯示目標性狀於此雜交後代族群中可能由隱性對偶基因控制。
4. 細胞學研究：於不同階段進行採樣，切片染色處理後進行細胞學觀察。
5. 第1次論文委員會會議：報告前一年度之論文研究進度，並依照委員意見進行後續研究方向調整。

● 111年

1. 分群分析法試驗材料建立：根據結果分為兩群，一群為具有目標性狀；另一群為不具目標性狀。每一單株單獨進行DNA萃取，再依據分群結果進行DNA樣品混合，兩DNA混合池分別進行全基因體定序。
2. 初步區間定位：定序結果以CLC genomics workbench (QIAGEN)進行組裝與分析，針對兩混合群體之共同突變進行分析，藉由該突變於兩群中出現頻率即可獲知目標基因的可能座落區間。
3. 縮小定位區間：擴大種植F2或F3植株，選取於初步區間有發生重組之

單株進行外表型鑑定。透過重組單株間之基因型與外表型交互比對逐步縮小候選區間。

4. 課程研習：

- R programming workshop

5. IPS2 young scientist symposium: oral presentation

6. 第2次論文委員會會議：報告論文研究進度，考量田間試驗進度受Covid-19疫情影響，且後續試驗仍需較長時間之田間試驗調查進行佐證，委員建議博士研究計畫可延長1年已獲得較完成之研究成果。

● 112年

1. 持續縮小定位區間

2. 博士論文撰寫與答辯

## 研究成果

### 定向誘導基因組局部突變技術

我們藉由 TILLING 探勘數個候選基因上的突變以探勘控制目標性狀的可能基因。於候選基因 *TA1 (Target 1)* 基因上發現一剪接突變，且該突變家系的目標性狀表現發生改變。此一剪切突變位 *TA1* 的第 6 外顯子，為胞嘧啶轉為腺嘧啶之點突變，進而導致剪接位點產生變化。此外，同一突變家系中亦發現了另一個突變對偶基因，為另一候選基因 *TA2 (Target 2)* 的錯義突變。此錯義突變位於 *TA2* 基因之第 2 外顯子，突變的核苷酸變化是由胞嘧啶變為腺嘧啶，導致氨基酸由谷氨酸變為賴氨酸。

為更進一步確認是何者為控制目標性狀改變的基因，我們針對第 3 代突變株(M3)進行自交方式以獲得僅在其中一基因帶有同結合突變對偶基因的個體，並進行外表行鑑定。外表型鑑定結果顯示 *ta1* 突變株表現改變之外表型，而 *ta2* 突變株的表現則與野生型相同，因此確認 *TA1* 基因與目標性狀之改變有關。

*TA1* 同時參與生長素和乙烯降解途徑，是這兩種激素合成中非轉錄酶調控的交叉點。為了解 *ta1* 突變體是否發生乙烯反應途徑的改變，我們進行了乙烯三重反應實驗。在黑暗中發芽一週後，*ta1* 突變體幼苗的下胚軸、主根和側根較於野生型幼苗更不發達。而在乙烯存在的情況下，野生型和突變體幼苗均表現出強烈的三重反應，但突變體受到的影響比野生型更大，顯示 *TA1* 基因的突變造成了植株對乙烯反應的改變。

TILLING 為高通量之反向遺傳學研究方法，可分離出於目標基因座發生突變的個體，為基因功能研究之重要工具。此外，EMS 誘導之突變族群內可能含有各種不同的突變，不需透過基因轉殖即有可能獲得想要的性狀，並可配合 TILLING 鑑定出同一基因座的不同突變對偶基因，因此 TILLING 被視為加速傳統誘變育種的重要工具。

### 分群分析法



將具目標性狀表現之親本 1 與不具目標性狀之親本 2 進行雜交產生 F1，再將 F1 進行自交產生 F2 分離族群。雜交所得之 F1 果實尺寸為中間型，而所有 F1 植株均不表現目標性狀，表明目標性狀可能由隱性對偶基因控制。F2 族群內單株外表性狀多樣，符合分離族群的特徵。針對 F2 植株在目標性狀的表現進行外表型鑑定，結果顯示非目標性狀特徵與目標性狀特徵呈 3:1 的比例，此表現符合由單一基因座上的隱性對偶控制的遺傳模式，我們以 TA3 代稱此一基因。

為了辨識控制目標性狀的 TA3 基因為何，我們將 F2 植株以是否表現目標性狀分為目標群 (T) 和非目標群 (NT) 進行群內的單株 DNA 混合，並以混合 DNA 池進行全基因體定序。兩群的定序組裝結果與參考基因組進行比較並計算了  $\Delta$  SNP 指數。於第 X 條染色體上找到與目標性狀有無具有連鎖關係之區間，此即目標基因所在之候選區間。

為了更進一步縮小候選區間，我們針對超過 700 株 F2 植株進行基因型鑑定，從中選取於候選區間內發生重組的植株進行目標性狀的外表型評估。透過比對重組植株的外表型與基因型資料，我們將區間縮小至 302 kb。將縮小後的區間以甜瓜基因組 'DHL92' v. 3.6.1 註釋數據庫進行比對，結果顯示該區間內存在 8 個基因，這些即為控制目標性狀的候選基因，然而實際控制性狀的基因為何則需進一步的功能性驗證以完成確認。

## 心得與建議

1. 各研究團隊下皆有數位專業技工，各自負責不同的行政或研究工作。各技工負責數項不同試驗技術操作或流程改良精進。當研究人員或研究生需要使用某項技術即可尋求專責技工的協助或技術指導。
2. 針對共用儀器設有管理小組，小組定期開會討論儀器使用狀況及維護保養等事項。部分精密儀器甚至須先通過管理小組培訓以獲得使用許可，此一作法可確保使用者具備正確操作的能力，降低儀器因不當使用造成損害，小組成員亦可提供使用者專業建議，讓研究者可以更有效率地獲得所需資料產出。
3. 研究所內設有生物資訊小組，該小組成員已針對數種常規生物資訊分析設置pipeline，研究者可簡便快速獲得分析結果。若有特殊之生物資訊分析需求亦可與生資人員討論，設計符合需求之分析方法。現今生命科學或農學研究對生物資訊的分析需求日漸龐大，此一做法或許可作為參考，幫助機構內研究人員解決資料分析難處。
4. 研究所內數個研究團隊會合作架設研究平台，筆者所在之研究團隊就與另一研究團隊共同架設轉錄體學與表觀遺傳學的研究平台，平台內容包括研究材料與試驗技術的建置。平台除了服務團隊內部的試驗需求，也是吸引外部合作的管道，外部研究團隊若需要特定的研究技術或材料就會和平台洽談合作可能。
5. 因應氣候變遷，近年許多研究著重於作物的抗逆境能力，有些研究計畫會於印度等國家進行試驗，以測試作物在高溫環境下的反應。台灣地處熱帶、亞熱帶交界，且具備良好栽培能力，未來若有機會與溫帶國家進行試驗合作，以台灣作為熱帶試驗基地或許為可思考的合作方向之一。
6. 分子生物相關試驗技術進展非常快速，各項商業服務也快速興起。隨著技術成熟，各項技術所需成本也隨之降低。以定序為例，現在許多研究團隊

會選擇直接將樣品送交外部私人公司，研究人員只需針對回傳之資料進行分析，此一作法會比團隊自行添購設備、建立分析流程更為方便且節省成本，且不需考慮數年後技術與設備的更新問題。在送交的試驗材料不涉及機密時，在比較成本與效率後，或許可以考慮選擇私人公司的服務。

7. 疫情後許多研討會或演講採取線上視訊形式，可節省場地成本，也可降低參與者的參加費用，未來預計仍會有許多研討會採用虛擬線上或混合模式，對研究人員參與學術研討會為一大利多。然而，實體研討會仍有其不可取代性，許多研究人員仍十分看重雙方實際見面交流，尤其是爭取或討論合作計畫時，因此建議未來研究人員除參與線上研討會外，也應持續進行實際參訪或參加實體研討會。
8. 一般而言，法國研究人員在下半年時就需事先安排下一年度上半年甚至全年度行事曆，因此若想邀請法方人員來參訪或演講等，建議可提前半年至一年前邀訪，以便對方安排時程。
9. 筆者所處之研究團隊與世界各地研究團隊皆有合作，也與種子公司有諸多合作，此外也招收由種子公司贊助獎學金之博士生，研究團隊可藉由此種管道獲得研究人力，種子公司則可獲得技術支援，雙方更可就彼此皆感興趣之議題有更緊密的實質合作。此種合作模式與農業菁英培訓計畫類似，感謝農業部提供經費讓筆者有機會赴法進修，也建請政府可持續提供此類進修機會。
10. 突變庫為珍貴且實用的試驗材料，農業試驗所建有水稻突變庫，善加利用可獲得許多產出。因TILLING所需成本相對較高，因此利用上可思考是否有其他經濟且有效率的利用方式。
11. 研究所內有來自世界各地的訪問學者、博士後與博士生，而近年來自中國的研究人員與博士生人數增長快速，此因中國政府鼓勵年輕研究者至歐美等國進行研究再返國，每年亦提供大量獎學金名額供出國留學，因此也有

不少研究團隊樂於招收中國留學生或博士後，並藉此機會與中國研究團隊建立合作橋梁。

12. 近年學術界對學術出版社的發表壟斷有諸多討論與反思，開放科學(Open Science)的風氣也因應而生。美國與歐洲國家針對由政府提供經費之研究計畫已有強制公開發表的相關規定，此類學術成果於期刊發表後，亦應遵照規定於特定平台發布以供公眾閱覽。
13. 因英語為學術研究之共通語言，至非英語系國家進修時儘管不會當地語言仍可進行學術研究。然而以實際經驗而言，並非所有機構內人員皆可以英語溝通，特別是技工或行政人員。因此建議至非英語系國家進修時最好具備當地官方語言的基礎或修習語言課程，對研究工作或進修生活都會有很大的幫助。