

出國報告（出國報告類別：研究）

研習德國植物表型體分析相關技術

服務機關：農業部農業試驗所

姓名職稱：李承彬 助理研究員

派赴國家：德國

出國期間：中華民國 113 年 5 月 25 日至 6 月 7 日

報告日期：中華民國 113 年 8 月 6 日

摘要

本計畫至德國參訪之目的在於了解植物表型領域之最新進展，以更有效地將數據轉化為有意義的育種性狀，並將其經驗應用於國內的表型系統。有關微觀及根系表型分析部分，參訪洪堡大學陳祖威教授團隊，進行微觀氣孔特徵研究與深度學習技術交流，並實際進行高通量根系表型系統(rhizotron)之資料分析，探討植物的根系交感作用。在表型體先進設施及相關應用部分，參訪了萊布尼茲植物研究所(IPK)，包含全球最大的 IPK 種原庫、PhenoSphere 表型設施、各種規模的輸送帶表型系統，以及微觀表型實驗室。此次學術參訪深入了解國際先進的植物表型分析技術，借鏡並研習國際表型體領域之研究經驗，以期提升國內植物表型體分析技術層級及其應用廣度。

目次

1. 目的	4
1.1. 前言	4
1.2. 參訪行程	5
2. 參訪內容	6
2.1. 德國洪堡大學	6
2.1.1. 微觀表型分析參訪與交流	6
2.1.2. 根系資料分析	8
2.2. IPK 研究中心	11
2.2.1. 種原庫	11
2.2.2. 不同規模的輸送帶表型分析系統	14
2.2.3. 環境模擬表型系統---PhenoSphere	18
2.2.4. 微觀表型實驗室	20
3. 心得及建議事項	22

1. 目的

1.1. 前言

外表型分析選拔是作物育種的基礎，作為育種方法的選拔指標以達成育種目標。然而，因應氣候變遷之育種策略需高品質的表型性狀，使得育種上遭遇了「表型體瓶頸」。為了克服表型體瓶頸，各國陸續發展表型體設施及相關技術，近年來，隨著高通量表型體 (high-throughput phenotyping, HTP) 的發展，能夠以高時序性、自動化、客觀且大量的方式獲得龐大的表型資料 (Yang et al., 2020)。其中，農試所「國家植物表型體分析系統」亦於 112 年度完工，將投入植物表型研究 (林, 2022)。

感測器技術的發展為高通量表型體奠定基石，克服了表型體瓶頸，但隨之而來的是「解釋性瓶頸」。龐大的資料量意味著需要付出大量的努力，將大量的資料轉換成有意義的育種性狀，以建立性狀與基因型間的關係 (Smith et al., 2021)。此外，還需考慮性狀間的潛在關係，因為一個性狀的選擇可能會影響另一個性狀的價值。不僅如此，更需考慮與環境的交感效應，以評估育種目標在環境的適應性 (van Eeuwijk et al., 2019)。因此，如何系統性地將大量的資料轉換成有意義的育種性狀，以及如何解釋複雜性狀，成為了表型體學的下一步挑戰。

臺灣屬亞熱帶氣候，作物的耐熱性及抗病性為耐逆境育種之首要目標，然而，這些性狀多屬於複雜性狀，即便高通量表型體設施能進行解構性狀，僅限於對器官層次的了解，其與細胞內體學(基因組、轉錄組、蛋白質組、代謝組)間仍存在巨大的尺度鴻溝，並對其中的特徵所知甚少，一方面原因在於細胞和組織具有高度特異性。因此，「微觀表型」基於組織和細胞尺度上所觀察性狀研究，則彌補了其中的鴻溝 (Zavafer et al., 2023)。在微觀層面上對這些性狀進行表型分析，將有助於在宏觀層面上對有利的複雜性狀進行精準辨識和系統理解。微觀表型之優勢在於，聚焦於組織或細胞層次，更利於種原或特異性狀之篩選。例如，德國萊布尼茲植物研究所 (IPK) 利用微觀表型體學，篩選多樣化的穀類作物抗性機制，包含：小麥白粉病及鏽病等。此外，研究組織或細胞的特異性為耐逆境育種的重要目標，例如，氣孔複合體 (stoma complex) 之特異性對於植物水分利用效率有著重要的影響。

隨著氣候變遷的挑戰，以及全球淨零排放之趨勢，植物的碳固定成為了一項重要研究議題。植物根系是一個巨大的碳庫，儲存了世界上大約三分之一的植物量，因此，了解根系競爭及相關交互作用，對於預測植物碳吸收和設計緩解氣候變化的策略至關重要。不同於地上部交互作用的研究，根系研究往往需要破壞性取樣，並且耗費大量人力物力，對於根系交互作用研究，更是受到取樣方法的限制，無

法觀察根部而受到阻礙。對此，德國萊布尼茲植物研究所(IPK)所建立之PhenoSphere 表型設施，可以模擬趨近於田間的環境條件，並設有地上部及根系的表型系統，藉由高時序性且非破壞性的表型測量，不僅得以更進一步的探索植物與環境交互作用，地上部植物間的交互作用，更得以首次用高通量表型設施探索根系交互作用。

臺灣之表型體領域尚在起步階段，須借鏡並研習國際表型體領域之技術，以提升國內植物表型體分析技術層級及其應用廣度。德國為重要表型體技術研究的先進國家，因此，本計畫至德國參訪植物表型領域之最新進展，以更有效地將數據轉化為有意義的育種性狀。此外，為了解表型體發展之最新研究趨勢，本計畫人員至德國萊布尼茲植物研究所(IPK)參訪最新的PhenoSphere 設施及微觀表型實驗室，並與德國洪堡大學陳祖威教授團隊交流，進行高通量根系表型系統(rhizotron)之資料分析，探討植物的根系交感作用。

1.2. 參訪行程

天數	日期	行程
1	5月25日(六)	桃園→法蘭克福
2	5月26日(日)	法蘭克福→柏林
3	5月27日(一)	洪堡大學技術交流(微觀表型研究)
4	5月28日(二)	
5	5月29日(三)	
6	5月30日(四)	
7	5月31日(五)	參訪萊布尼茲植物遺傳學和農作物研究所(IPK) Gatersleben
8	6月1日(六)	洪堡大學技術交流 (高通量根系表型研究與資料分析)
9	6月2日(日)	
10	6月3日(一)	
11	6月4日(二)	柏林→法蘭克福
12	6月5日(三)	
13	6月6日(四)	法蘭克福→桃園
14	6月7日(五)	

2. 參訪內容

2.1. 德國洪堡大學

陳祖威教授團隊研究領域包含植物交互作用、植物生理模型，以及新技術開發與表型設施應用。在高通量植物表型分析於作物生理學研究上，具有相當豐富的研究成果，並提供了利用對植物與植物相互作用的新見解，來促進設計種植系統和植物育種。近年來其研究結合了表型平台、多尺度和多維建模方法，來研究同質和異質冠層下生長的玉米、小麥和黃瓜的基因型間和基因型內相互作用。



圖為陳祖威教授研究室與王天成博士。

2.1.1. 微觀表型分析參訪與交流

微觀氣孔特徵為新興的耐逆境性狀，較小的氣孔有助於更快的反映環境變化，並維持高膨壓。此外，在萵苣上亦被證實，小氣孔特性與高生物量有關 (Armitrono et al., 2022)。然而，氣孔觀測通常難以作為育種應用，原因在於傳統的「指甲油翻印法」非常耗時，並需在顯微鏡下觀察。但近年來，隨著顯微設備及機器學習技術的進步，以手持數位顯微鏡進行即時氣孔辨識，並藉由深度學習技術將自動量測氣孔特徵，得以快速觀察氣孔性狀，並應用於耐逆境育種。近年來，微觀表型技術亦應用於作物的早期病害快速檢測，傳統檢測方法費時、費力、主觀性強，藉由深度學習技術結合微觀表型，可大量且精準的檢測複雜情況下的病原體孢子(Li et al., 2023)。

本次至洪堡大學參訪並進行了微觀氣孔表型的技術交流與討論，農試所方與洪堡大學皆在發展手持數位顯微鏡應用於氣孔表型的技術。其中，農試所方主要

以番椒作物為基礎，開發顯微氣孔調查工具，並訓練氣孔辨識模型，建立即時辨識系統，以應用於育種篩選。洪堡大學則進行小麥氣孔的長寬等量化辨識，並結合生理指標進行植物生理研究。生理研究使用了 60 種小麥的優良基因型，並進行了氣孔、高光譜與光合作用測量系統之生理建模。此外，兩方所使用的顯微設備略有不同，也針對如何在顯微觀察時保持穩定的對焦平面進行交流，洪堡大學在葉片下方使用了高密度海綿以確保焦距的穩定性，而農試所方則採用訂製夾具以固定葉片。

此外兩方也討論了此技術適用作物，以及顯微辨識的適用性，例如：德國方感興趣的油菜作物，因葉表具有蠟質，增加了調查的困難性。農試所過去嘗試數種作物，亦發現葉絨毛容易干擾顯微鏡之對焦。此外，氣孔凹陷的蝴蝶蘭同樣難以調整其對焦平面。對於小麥及番椒而言，因其葉表結構相對簡單，能夠應用此技術進行即時拍照與辨識，但對於葉表結構複雜者，指甲油翻印法為更保守的方法，並同樣能應用本技術加速氣孔性狀的自動化測量與量化。



使用 LICOR 測量小麥生理參數。



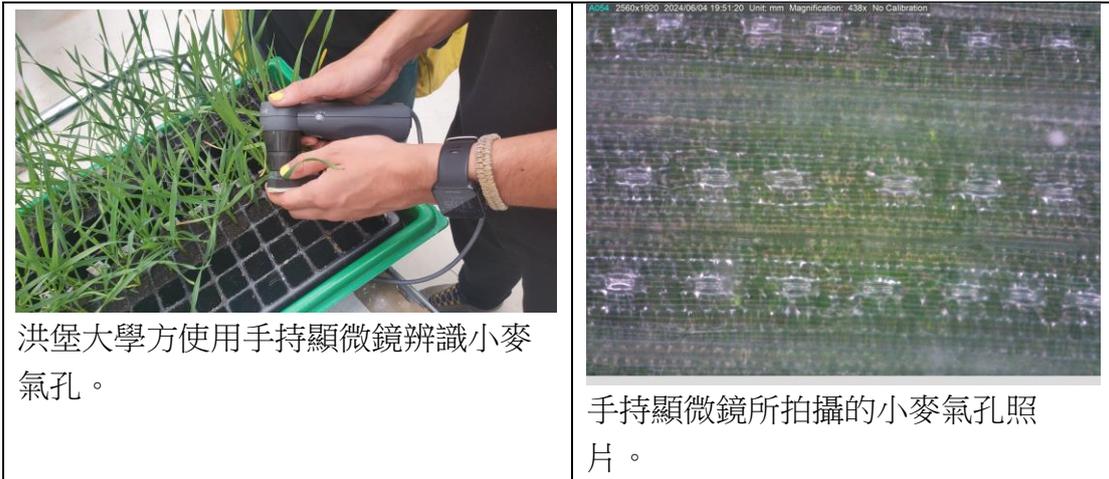
於生長箱培養 60 種小麥基因型。



使用高光譜儀測量小麥光學波段特徵。



農試所方使用手持顯微鏡即時辨識小麥氣孔。



洪堡大學方使用手持顯微鏡辨識小麥氣孔。

手持顯微鏡所拍攝的小麥氣孔照片。

2.1.2. 根系資料分析

根密度（即每體積土壤單位的根生物量）是一個重要但經常被忽視的植物性狀，它包含有關植物地下部吸收養分及投入相應資源的資訊。在氣候變遷的挑戰下，了解植物如何分配地下生物量對於準確評估作物的碳儲存非常重要，此外，了解這些品種對不同植物密度的反應，有助於優化作物資源利用效率和最大限度地提高糧食產量，並提供相應的生理機制與表型特徵於育種者設計和培育理想品種。

然而，由於土壤中具有各種因子，包含非生物（土壤中的資源）和生物（根部感測、植物間交互作用、土壤微生物），亦包含了其因子間的交互作用，使得植物的根系分配策略很複雜。不僅如此，根系的研究往往需要破壞性取樣，耗費大量的人力物力資源，交互作用之探討更需要高時序的性狀測量，使得多因子且高時序的根系研究具有相當的挑戰。

德國萊布尼茲植物研究所(IPK)所建立之 PhenoSphere 表型設施，對於以上的研究困境提供了解決方式。該設施除了可以模擬趨於外在環境條件及自動化控制灌溉，其中配有 rhizotron 系統，可以同時擷取地上部及根系的表型影像。該系統共有 360 個根箱，並由兩個移動影像站自動化拍攝。根箱的大小寬度 60 公分、長度 90 公分且最小厚度僅為 5 公分，並具有透明的前板。在此種設計下，根部可沿著透明的前板生長，因此許多根系結構特徵可以通過影像擷取的方式觀察進行破壞性的觀察。藉由高時序性且非破壞性的表型測量，不僅得以更進一步的探索植物與環境交互作用，地上部植物間的交互作用，更得以首次用高通量表型設施探索根系交互作用。為探討作物根系之交互作用機制，陳祖威教授團隊與 IPK 合作，使用 PhenoSphere 的 rhizotron 系統，進行了小麥根系交互作用之表型設施研究試驗。此試驗以根系表型系統進行非破壞性掃描，並首次以多因子且高時序性試驗探討根系交互作用。

在本次技術交流中，我們分析了此試驗資料，試探討「地上部競爭與根系分佈之關係」。試驗包含了 2 種基因型、2 種氮肥處理、3 種地上部種植密度等因子，並持續掃描 48 天。掃描的原始資料為影像資料，經過影像二值化處理後，提取根系部分，並計算其特徵。每個試驗單位中，最終輸出的資料形式包含：x 軸像素 1 維陣列、y 軸像素分佈 1 維陣列、56 種根系性狀。本次研究目的為探討地上部競爭與根系分佈之關係，並假設地上部競爭不影響根系分佈，主要分析根系 x 軸及 y 軸分佈資料，從中提取特徵資訊。

在分析前須進行資料前處理，此筆原始資料分布於各個掃描時間點的資料夾中，因此需要遍歷所有資料夾並使用正則表達式讀取相應的檔案名稱，再批次彙整成分析所需使用的格式。其中 x 軸像素及 y 軸像素分別彙整成 3 維陣列，性狀則彙整成 2 維資料框架。下一步為資料的探索式分析，用於視覺化呈現高維度的資料，並探索潛在的趨勢或併變因子及雜訊等。在分析資料時發現，影像二值化時可能仍會帶入雜訊，但這些雜訊出現在固定位置，且並不會隨著時間有所變動。因此，去除此雜訊的方式為每個時間點減去定植後第 1 天的資料，以去除固定位置之雜訊。

接下來的探索式分析使用 R 軟體的 plotly 套件並互動式圖及動畫圖輸出，目的是為了盡可能的在圖中盡可能的視覺化高維度資訊，包含基因型、生長密度、生長時期等。呈現以 x 軸、y 軸根系生長動畫圖及互動式直方圖。互動式圖的優點在於可以點選所欲觀察的特定試驗單位加以比較。當確定資料無特定影響分析的因子後，則可進行統計量提取與統計分析。

由於此資料屬於高時序性資料，因此，分析方法為針對每個時間點提取各試驗單位的統計量及其信賴區間，然後再將每個時間點的信賴區間繪製成連續性的信賴區間圖。其中，需提取的統計量包含標準差、最大值、四分位距等。因此至目前的步驟為止，已出現地上部種植密度、x 軸 y 軸、日期、各種統計量等高維度複合因子，未來尚須探討基因型、氮肥處理等因子，故需建立模組化資料分析流程，以完成高通量的資料分析。因此，本研究針對各步驟建立分析模組，並使用管線運算子串連各模組，每次的圖表輸出皆由原始資料經各模組運算而產製，以確保分析過程的正確性及避免過多的資料冗餘。

最終的分析結果顯示，在各個統計量的信賴區間圖中，無論是在 x 軸或 y 軸，地上部的種植密度並不影響根系分佈的發展。本研究釐清了根系交互作用研究中的一項重要問題，有助於進行更進一步的探討，包含根系分佈與各個因子的關係，並發展根系分佈的統計模型。本次分析結果以 R markdown 形式編寫，並以 html 檔輸出成資料分析報告(僅節錄報告目次如下圖)。

rhizotron at y-axis with 3 Shoot_Competi_Levels

Cheng-Bin Li

2024-06-04

- Data prepare
 - Setting Path & arrange of sub-folder
- Data overview
 - Distribution plot by ID in conditional date
 - @draw Distribution plot in 20th day (2023-09-27)
 - @draw Distribution plot with group in 20th day (2023-09-27)
 - @draw Distribution plot with group in animate
 - Distribution plot which Aggregate y_axis to several intervals
 - @ draw Distribution plot in 20th day (2023-09-27) & divide into 100 intervals
- Data analysis
 - Q1: Is shoot competition affect root architecture at y axis?
 - @ SD CI Plot
 - @ Mean CI Plot
 - @ Max CI Plot
 - @ IQR CI Plot
 - @ sum_pixels CI Plot
 - Q2: Is SD different when we fit normal dist. to get it? -> no affect
 - @ Get SD by fitting norm. dist. & draw CI plot
 - Q3: How to remove noise? -> By minus the previous day value
 - @ Draw distribution plot which minus the first day value, and represent in 20th day (2023-09-27)
 - @ Draw CI plot which minus the first day value
 - Q4: How is growth dynamic at x axis?
 - 1. minus the previous day's value
 - 2. Setting n days interval

Data prepare

Setting Path & arrange of sub-folder

```
load("root_y_HML.RData")
```

```
root_y_HML <- root_y_HML[1:6562,,]
```

Data overview

Distribution plot by ID in conditional date

draw_dist()

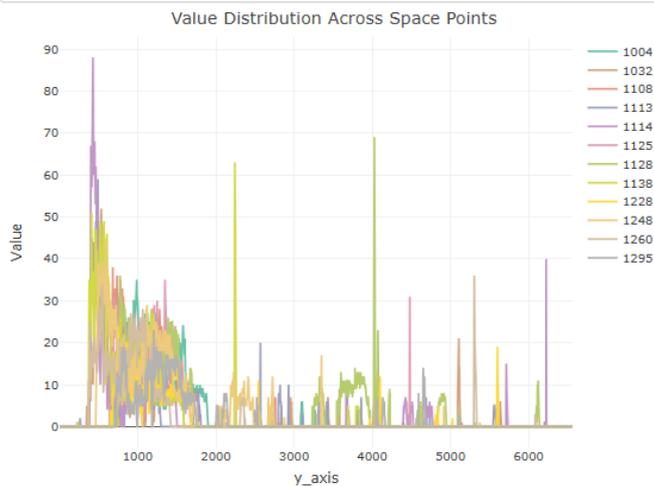
draw_dist_group()

@draw Distribution plot in 20th day (2023-09-27)

```
root_y_HML %>% draw_dist(., 1)
```

```
## Warning in RColorBrewer::brewer.pal(N, "Set2"): n too large, allowed maximum for palette Set2 is 8  
## Returning the palette you asked for with that many colors
```

```
## Warning in RColorBrewer::brewer.pal(N, "Set2"): n too large, allowed maximum for palette Set2 is 8  
## Returning the palette you asked for with that many colors
```



2.2. IPK 研究中心

對於因應氣候變遷下的挑戰，如何結合種原與表型設施進行耐逆境育種，為農試所建立表型體系統的主要目標。IPK 為萊布尼茲體系的非營利研究機構，具有世界上最古老和最大的種原庫之一，以及全球獨特的植物環境模擬系統（IPK PhenoSphere）。在 IPK 中，由種質資源蒐集系中蘊含著巨量遺傳多樣性，不僅被保存，還被實際用於解決基礎科學問題，並落實於作物育種中，為農業基礎研究發展的學習標竿。

IPK 的研究主題相當全面，具有五個跨部門和跨學科的領域，分別為植物遺傳資源的增值、基因組多樣性與進化、植物繁殖機制、生長與代謝以及抗性與耐逆境機制。其中植物遺傳資源的增值及抗性與耐逆機制配合密切，並成功的利用種原結合表型體設施，篩選出耐逆境品系(如小麥耐旱研究)。此外，IPK 具有獨特的微觀表型研究室，結合表型體、植物病理及種原，提供大規模病害篩選的方法。本次主要參訪遺傳資源部門及表型研究部門，學習表型領域最新的發展及整合技術，以下將詳細介紹參訪內容。



圖為 IPK 研究中心大門。

2.2.1. 種原庫

IPK 研究中心的基因庫部門為世界上最大的種原庫之一，目前擁有 151,348 份樣本。該部門的任務是保護農業生物多樣性，並向研究社群提供植物遺傳資源，並分布於 Gatersleben、Groß Lüsewitz 及 Malchow 三個地點。而大部分種原儲存在 Gatersleben 的種原庫中。除了以種子形式保存的樣本外，種原庫還維護世界上最大的無性繁殖植物的冷凍收藏之一；此外，還管理著一個包含超過 446,000 個標本的植物標本館，約 109,000 個種子/果實參考樣本和 56,600 個穀物/草本標本。

在種原庫的參訪中，由種原庫部門的負責人 Andreas Börner 教授親自接待，Börner 教授介紹到，種原庫部門研究重點是改進遺傳資源的保護管理，主要涉及探索影響種子和植物器官長期儲存的生物和生化過程。在 IPK 種原庫提供了小麥、大麥及黑麥等重要糧食作物的基因組研究，藉由研究演化、分子基礎以及種內多樣性，為作物對環境變化的適應提供重要見解。因此研究內容也包含對每種物種的核心蒐集系進行 DNA 序列的系統性建庫，以及對樣本外表性狀進行分析，並持續的為種原的基因型及外表型資料建立數位資料庫以提供因應氣候變遷的作物學研究。

在 Börner 教授的帶領下，得以實地參觀 IPK 的短期、中期及長期種原庫，並熱心的展示正在種原更新的黑麥種原。IPK 種原庫的特色在於，為了確保所蒐集種原的正確性，不僅保存與維持種原，並建立了禾本科穗及粒的標本庫，各式種子及果實標本庫，以及其他豐富種原的植體平面標本，其中平面標本現今皆以進行了數位掃描，能夠在 IPK 的種原庫網站上調閱。藉由實體標本的參照，能夠更精確的鑑別種原的正確性並協助研究人員完成物種分類。



Börner 教授介紹短期種子庫並展示黑麥種原。

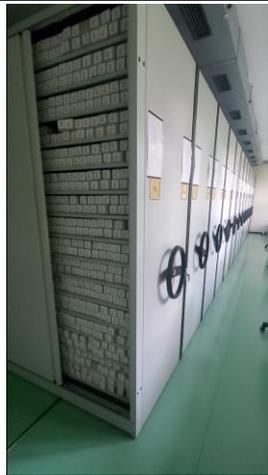
不同型態的保存方式。中長期的種子真空袋(左)，乾燥室正在製備的黑麥種原標本(右)。



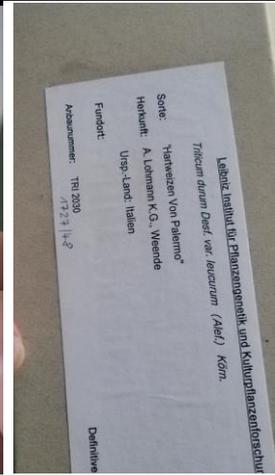
Börner 教授介紹入庫流程(上)，以及種子乾燥室(下)。



種子檢查室的同仁，以及正在進行中的綠豆種子發芽試驗。



禾本科標本室及樣本。



禾本科標本標示資訊。



草本標本室，現已使用掃描機電子化。



種子標本室，大豆種原標本(右)。



2.2.2. 不同規模的輸送帶表型分析系統

IPK 擁有小、中、大型共 3 種規模的高通量輸送帶系統，由 IPK 的自動化表型分析團隊負責人 Kerstin Neumann 博士親自介紹，並由設備技師 Ingo Muecke 示範操作。這些系統與農試所的植物表型系統相同，主要由 Lemna tec. 公司開發，並於此基礎上進行模組的擴充。Kerstin 介紹到這 3 種規模的系統對應不同的植株承載量及規格。例如：小型規模系統主要可用於阿拉伯芥之研究，而中型規模系統則可用於禾本科，如小麥等中型植株。大型規模系統可用於玉米等植株研究。

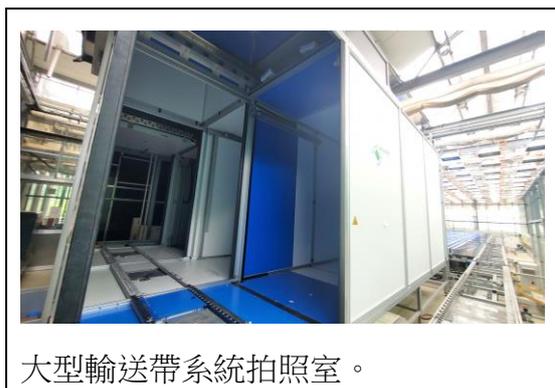
首先，我們參訪了小型系統，其建立於環控生長室，主要分為兩個空間，分別為生長室及拍照室，由一個閘門連通，並藉由輸送帶傳輸植株。在生長室中，具有高密度且可控的 LED 生長燈模組，可模擬戶外實際的高光量環境。因此，在進入生長室前，需要配戴太陽眼鏡以避免操作過程對眼睛造成危害。輸送帶的規格上，可容納 384 個載台，每個載台可根據不同需求，承載單一植株盆(最多容納 384 個植株)、6 孔苗盤(最多容納 2304 個植株)，以及 12 孔苗盤(最多容納 4608 個植株)。在拍照室部份，具有 3 個拍照模組，分別為可見光，與葉綠素螢光感測器，這些模組可視拍照需求進行裝設及拆卸調整。除了小型系統的拍照設備，IPK 亦具備有獨立的拍照設備，適合非高時序性掃描的試驗，容許更加彈性的載台規格，但同樣可搭配輸送帶系統使用。例如 PSI 的 PlantScreen SC system，具有葉綠素螢光拍照功能，PSI 的根部拍照設備，可拍攝方形小盆的 4 面根系生長情形。

接下來，我們參觀了中型輸送帶系統，同樣為 Lemna tec. 所開發。此系統與澳洲表型體中心(APPF)的規格相同，具有能夠承載 4 寸盆的載台，最高能承載 520 株

植株（每個載台 1 株）。Kerstin 博士介紹到，此系統由 2008 年設置至今，已經歷了 16 年，依然能順暢使用。在拍照設備規格部份，具有可見光以及葉綠素螢光拍照室，輸送帶系統則配有自動化養液澆灌系統。並已執行了許多的試驗，包含小麥的耐旱、耐熱等非生物逆境試驗。

最後，我們參觀了大型輸送帶系統，輸送帶的規格上，可容納 396 個載台，每個載台可根據不同需求，承載單一植株盆，最多可承載 4 株植株盆(全載可容納 1584 株植株)。拍照規格的部份，拍照室可進行可見光範圍（390-750 nm）和近紅外範圍（1450-1550 nm），以及葉綠素螢光（激發光譜：400-500 nm，發射光譜：520-750 nm）拍攝植株。在拍照室中同樣具有旋轉控制機構，以便以不同角度進行側視圖成像。其中，近紅外光系統主要為根系拍攝所另行開發，需使用專門的根系拍照載台與盆具。為了良好的拍攝根系生長情形，盆具設計有斜面板，對於可見光不透明但對紅外光具有穿透性，因此能使根系不受光線影響生長，又能以近紅外相機拍攝沿斜面板生長的根部。設備技師 Ingo 說明，根系拍照盆的斜面設計，主要是為了使根系能靠重力貼合斜面板生長，此外亦能測量更大的根系截面積。而另一項巧思在於，為避免盆中積水無法排除，根系拍照盆的斜面空間底部留有縫隙，能連通一旁的長方體空間，長方體空間能放置海綿以控制水分吸收。

Kerstin 博士提醒我們，為使影像作業能夠順利擷取植株特徵範圍，除了載台使用藍色壓克力設計，植株的支架同樣需使用藍色或黑色，並在盆上鋪設藍色透水墊，以利在俯拍時區分植株與土壤區域。



大型輸送帶系統拍照室。



大型輸送帶系統輸送帶及載台。



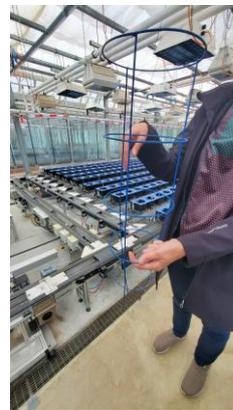
根系拍照盆，具有特製的斜面構造與排水空間。



根系拍照系統，為 PSI 擴充模組。



利於影像處理所訂製的藍色支架與透水墊。



利於影像處理所訂製的藍色支架，主要用於禾本科固定株型用。



中型輸送帶系統拍照室。



中型輸送帶系統輸送帶及載台。



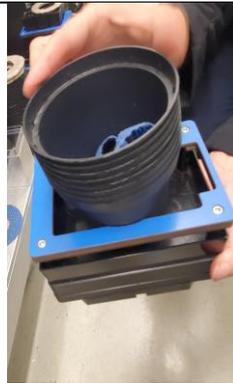
小型輸送帶系統，輸送帶生長區(上)與拍照區(下)。



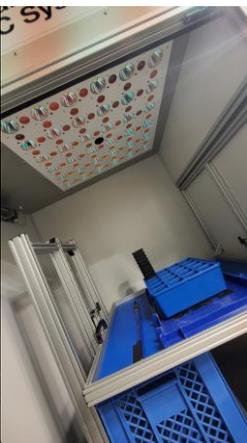
生長室用防護眼鏡(左)，輸送帶區與拍照區連通道(右)。



小型輸送帶系統拍照模組，Kerstin 展示葉綠素螢光模組(右)。



小型輸送帶系統載台，可適用不同盆具。



葉綠素螢光拍照設備。



根系拍照設備，可拍攝根系 4 面的生長情形(右)。

2.2.3. 環境模擬表型系統---PhenoSphere

IPK 近年來建立了全球獨有的環境模擬表型設施，同樣由 IPK 的自動化表型分析團隊負責人 Kerstin Neumann 博士與生物學家 Ricardo Giehl 博士親自介紹。Kerstin 博士介紹到，植物在環控條件(溫室或氣候室)與田間環境間的生長仍有差異，使得研究經驗的轉移遇到了阻礙，為目前表型設施研究面臨的瓶頸。此外，面對氣候變遷的挑戰，我們需要因應未來的環境進行模擬，並具有再現性，以了解作物在面對逆境下的真實表現。為了彌補溫室環控至田間環境的落差，並模擬未來(或過去)氣候條件，IPK 建置了 PhenoSphere 環境模擬表型系統，可以嚴格控制環境條件(光、溫度、濕度、CO₂濃度等)，於 IPK 團隊在 2023 年的實證研究顯示([Heuermann et al., 2023](#))，PhenoSphere 除了可以還原真實田間環境，其中玉米的生長表現亦趨近於田間測量值。

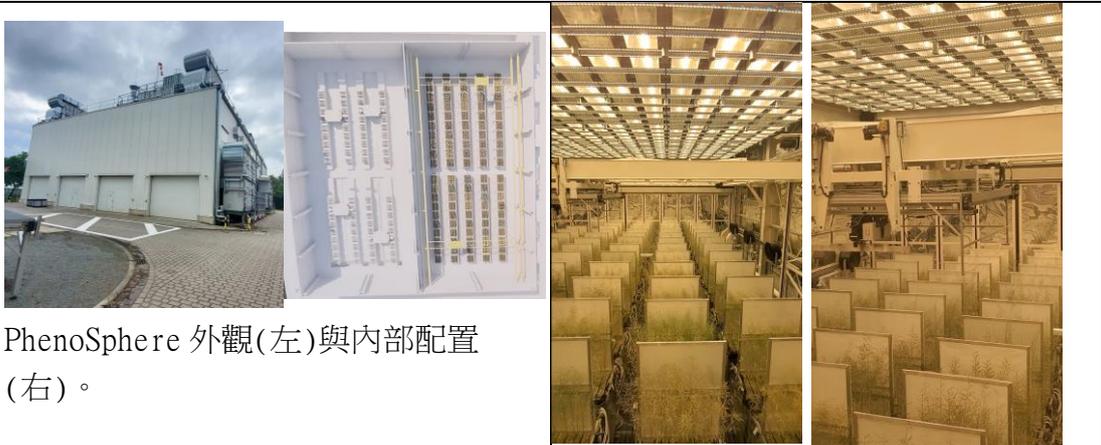
PhenoSphere 具有兩個模擬室，分別安裝了兩種不同的表型分析系統，而兩個模擬室可視情況再隔離成兩間，一共可同時創造 4 種環境。

第一種是根系表型(**rhizotron**)系統，該系統共有 360 個根箱，並由兩個移動影像站自動化拍攝。根箱的大小寬度 60 公分、長度 90 公分且最小厚度僅為 5 公分，並具有透明的前板，每 5 個根箱為一單位以傾斜角度放置於金屬載台中。在此種設計下，根部可沿著透明的前板生長，因此許多根系結構特徵可以通過影像擷取的方式觀察進行破壞性的觀察。Rhizotron 的拍照系統為軌道式的移動影像站，可以同時擷取地上部及根系的表型影像。地上部的照相設備為高解析度 RGB 相機，根系的照相設備為單色相機，能夠以高解析度的方式辨識根系生長情形。

Ricardo 博士進一步的說明 rhizotron 系統的試驗流程，每個根箱須在作業區中進行填土作業，土須分數層填入根箱中，且需均勻的夯平，每 5 個根箱置入載台中，並以吊具移入模擬室。此過程如同以往的高通量表型體設施，為了打造均質化的栽培條件，仍需要大量的專業人力，包含器械的操作與均一化的栽培。

在第二個系統中為容器(**container**)系統，植株可以盡可能的模擬田間種植條件，種植在約 1.5 至 3 立方公尺的大型容器中，整間模擬室可容納 110 個大型容器。在環境控制部份，包含高度可變色域的 LED 系統，可以精確的模擬田間的受光環境。此外，模擬室的牆為金屬鏡面，除了可使作物均勻受光，並減少邊行效應的影響。除了溫度濕度可以調控，模擬室中具有完整風扇組以模擬植株在真實環境的受風條件。在這個系統中，可以趨近於真實的模擬環境，包含田間環境中細微的光質條件波動。不僅如此，容器中還將配有土壤調節系統，除了可以調節土壤溫度，也可以進行精確灌溉。感測器部份，該系統具有俯拍型的天車系統，並配有 RGB、3D、高光譜及葉綠素螢光等各種感測器。在參訪時，有觀察到天車

系統的移動，Kerstin 博士解釋，除了進行掃描時，一般情況下天車也會隨機移動，目的是為了避免設備的遮蔭效應。Kerstin 博士也進一步的分享近期的研究成果，為了研究油菜的穗上發芽情形，他們利用的模擬室模擬出高濕度的環境，並成功的篩選出不同穗上發芽程度的油菜基因型。



PhenoSphere 外觀(左)與內部配置(右)。

container 系統正進行油菜試驗，俯拍型天車感測器(右)。



Rhizotron 系統內部實景(左)，LED 光控系統(右)。

位於 2 樓的控制室，及控制室監控窗的視野。



Rhizotron 照相站及內部實景。

Ricardo 博士說明 Rhizotron 試驗準備流程。

2.2.4. 微觀表型實驗室

IPK 具有表型體領域獨特的微觀表型(Microphenomics)研究室，本次的參訪由微觀表型研究室負責人 Dimitar Douchkov 博士親自介紹。Dimitar 博士為植物病理機制專家，研究領域為植物-病原體的交互作用，並發展微觀表型設施以推進新的抗病基因和機制研究。

Dimitar 博士介紹到，植物-病原體的交互作用仰賴大量的顯微技術觀測，然而，顯微鏡檢查非常耗時費力，難以應用於大型表型篩選。因此，微觀表型結合高通量自動顯微鏡、宏觀光學設施(macrosopy，無須顯微設備)以及深度學習影像分析工具，以將表型體學所需的高通量和精度結合微觀領域。

IPK 團隊開發了 BluVision 平臺，用於在微觀和宏觀尺度上的高通量表型分析。該系統包含了硬體、軟體和資料管理模組組成，主要針對大麥和小麥白粉病的表型分析。BluVision 平臺提供表型體學與基因體學的連結，提供植物病理學家和育種者之視角，探索具有高度潛在興趣的新型抗病基因。此外，該系統優勢在於，能夠實現手動測量方法難以獲得的表型，例如精確定量真菌菌落，並提供高通量的表型掃描。BluVision 平台分為兩個模組，分別為 BluVision Micro 模組以及 BluVision Macro 模組。

BluVision Micro 是一種自動化高通量顯微鏡系統，用於細胞和亞細胞解析度的表型分析。此系統之設備基於自動化玻片掃描系統(Zeiss Axio Scan.Z1)，在高解析度的顯微系統下，能夠提供多個焦距、明度、螢光波段的大數據掃描。掃描後的高維影像，可透過基於人工智慧的自動化分析流程，以提取相關表型。目前

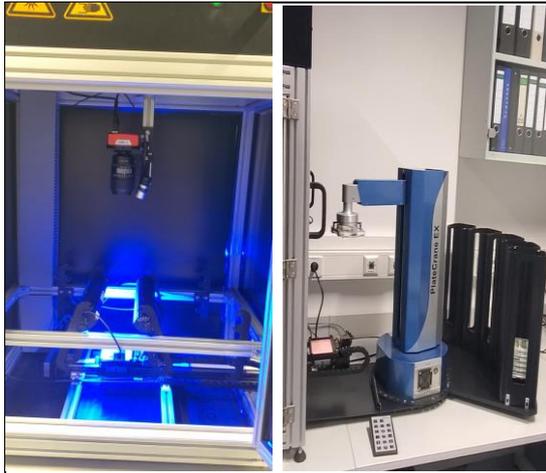
為止，已使用該系統建立白粉病與穀物相互作用的表型分析流程。

另一項模組為 BluVision Macro，是由 IPK 與 Fraunhofer IFF 合作開發的病害面積辨識機器人系統(Macrobot)。Macrobot 可用高度自動化的方式獲取微量滴定板 (microtiter plate) 中不同樣本 (例如受感染的葉子) 的圖像。因此，該系統可以精確、可重複地量化受感染葉面積的百分比，每日可掃描高達 10,000 個樣本，使病害篩選方法推及至育種族群或大型種原收集。BluVision Macro 的感測器為單色相機，並分別使用 RGB 燈條主動補光拍攝，相比於一般 RGB 相機，此法可在更高的解析度下提取每個 pixel 的色彩參數。Dimitar 博士進一步的解釋，他在 BluVision Macro 上嘗試了許多種的色彩參數組合，最終發現使用 minRGB 函數為最具穩定且簡單有效的病害量化方法。但 Dimitar 博士也說明，病害量化並非一體適用，需根據特定的病害量身打造量化流程，並須配合適當且穩定的接種平台，以及適合的種原或育種族群。



微觀表型研究室(上)，以及各種病原培養皿(下)。

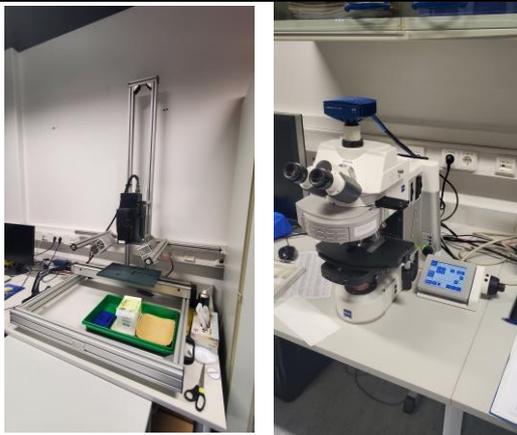
BluVision Macro 載有小麥接種葉的微量滴定板(左)，搬運微量滴定板的機器人系統(右)。



BluVision Macro 中樣本由機器人搬運至拍照箱，分別以紅綠藍光照明拍攝。



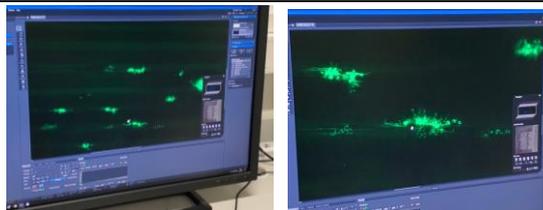
BluVision Macro 的影像處理系統，建立影像遮罩以提取感興趣的葉片區(右下)。



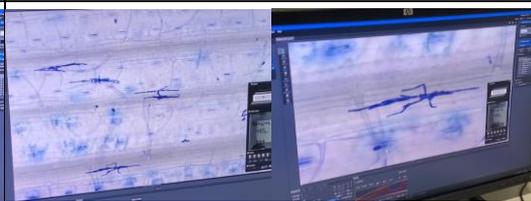
高光譜設備(左)與高倍率顯微鏡(右)。



自動化玻片掃描系統(Zeiss Axio Scan.Z1)(左)，與染色後的玻片(右)。



具有高倍率的病原菌螢光染色影像。



具有高倍率的病原菌染色生長影像。

3. 心得及建議事項

本計畫至德國參訪之目的在於了解植物表型領域之最新進展，以更有效地將數據轉化為有意義的育種性狀，並將其經驗應用於國內的表型系統。因此，本次至德國萊布尼茲植物研究所(IPK)參訪設施後，與 Kerstin 博士交流及請教表型領域

的發展與經驗。Kerstin 博士說，在擔任表型體部門的負責人之前，本身的研究領域為遺傳資源基因體學，博士時期的指導教授為 IPK 種原部門的 Andreas Börner 教授。為了探討作物耐逆境的基因體關聯性，常應用表型體設施測量育種族群的逆境表現，並成功的在小麥的育種族群上篩選出耐旱的候選基因。

Kerstin 博士也分享到，植物表型體為跨領域的學科，不僅需要在作物材料及特性上相當熟悉，更需了解設備及相關的技術細節。由於所探討的作物逆境表現多為複雜性狀，為了操作高通量表型設施，團隊內亦須有設備技師、作物栽培專家，以及資料分析團隊相互配合。即便如此，在進行試驗時還是會時常出現挫折，由於表型領域屬於新興領域，仍需要不斷嘗試錯誤並檢討，此階段更需要團隊的相互配合與支援。

對於臺灣的氣候條件與作物耐逆境研究，Kerstin 博士也分享了她在小麥耐逆境的研究經驗，並需要結合遺傳育種知識，而耐逆境試驗的成功與否，取決於該逆境性狀的遺傳力，以及是否能用提取相應特徵以增進遺傳力，就小麥耐旱性狀而言，其遺傳力可至 0.7，使得後續的基因體分析能順利進行。但 Kerstin 博士也說她曾嘗試了小麥的耐熱表型試驗，然而，因為熱處理條件的設定使得小麥無法獲得有效的產量數據，導致無法更進一步研究。整體而言，表型體試驗的整體規劃，需結合各個領域的經驗，面對未知的領域，需要付出時間、人力與精力，鼓勵團隊嘗試錯誤，並積極討論試驗流程並改進。在團隊的配合方面，Kerstin 博士的部門擁有 4 個設備技師，負責設備的維運、檢修及試驗操作，此外，當進行試驗時，需安排輪值人員以避免遭遇突發狀況。另外，Kerstin 博士認為，資料分析團隊為每個表型體機構必備的核心，而表型體研究通常會結合各式體學，如基因體學，導致每個試驗具有龐大的資料分析工作量，並通常需要耗費 10 倍於試驗的時間進行分析。IPK 擁有生物資訊部門能夠處理基因體資料分析，以及部份的高通量表型資料分析。

有關高通量表型資料分析的分工方式，分為影像數值化與統計分析兩部份，就輸送帶系統而言，其具有完善的影像處理軟體 LemnaGrid，可以進行影像數值化將影像資料轉換為特徵數值，即便如此，數值化後的特徵參數仍屬於高維度的大數據資料，因此這部份需要由合作夥伴視試驗目的，訂定適當假說，以進行後續的統計分析。

有關未來合作的部份，Kerstin 博士認為臺灣在病害表型上具有很大的合作空間，由於病害接種與量化技術為個案性的研究，不同的作物及病害皆需要進行試驗流程開發。臺灣作物相多元且具成熟的接種與病害量化技術，未來若能結合表型設備及影像處理的開發，在病害表型技術的交流與擴散具有很大的潛力。

在表型體的資料分析與應用上，與德國洪堡大學陳祖威教授團隊交流，進行高通量根系表型系統(rhizotron)之資料分析，並探討植物的根系交感作用。有關如何將數據轉化為有意義的育種性狀，陳教授分享到，在進行表型試驗時，需要有十分明確的研究架構，Aim、hypothesis、Question 及 Objective。而許多人常會搞不清楚 Aim 與 Objective 的差異，其中 Aim 是研究目的，而 Objective 是研究方法。在表型體研究中，由於具有龐大且複雜的研究方法，需要使用各式各樣的技術作為方法，然而最終需回歸到研究目的，例如：耐逆境育種或是探討根系交互作用等。

在實務操作面上，於進行資料分析前先訂定研究架構有許多好處，由於資料分析又分為探索性分析及統計分析，並根據統計分析結果回答先前所訂定的假說。而統計分析的第一步為定義問題，並找到適合的統計量以鑑別問題。因此，訂定研究架構後即能以統計邏輯進行資料分析，而非僅停留於資料探索性分析的層次。此外，訂定明確的目的與假說有助於減少分析成本。高通量表型體資料具有龐大的因子組合及交感作用，例如，本次的根系資料中具有：2 種基因型、2 種氮肥處理、3 種地上部種植密度等因子，並持續掃描 48 天，並具有 56 種根系性狀及 xy 軸密度分佈，因子組合可達上萬種。因此，在高通量表型試驗中，若無明確的目的與假說，進行資料探索性分析，可能會耗費大量的分析成本與人力。

另外，在此次資料分析的過程中，再次體認到了資料流程模組化的重要性。即便已定義研究目的與假說，仍需尋找適合的資料前處理方法、統計分析方法，以及探索資料的離群值與分佈等流程，導致具有龐大的分析工作量。而龐大的分析量與複雜的流程，又會提高演算錯誤的風險。因此，本次資料分析針對各步驟建立分析模組，並使用管線運算子串連各模組，每次的圖表輸出皆由原始資料經各模組運算而產製，以確保分析過程的正確性及避免過多的資料冗餘。過去在農試所天車表型資料的經驗中，已建立完整的模組化資料分析流程，最終根據模組分析流程開發出高通量資料分析的視覺化分析軟體。綜上，資料流程模組化為開發有意義育種性狀的重要技術，此技術在農試所表型體試驗中已累積相當的經驗，並具有與其他表型體機構合作與串連之潛力。

整體而言，確立表型體試驗的研究架構，不但有助於團隊的討論與經驗累積，訂定明確的目的與假說，更有助於減少分析成本。臺灣之表型體領域正在起步階段，並已具有大型溫室及田間的表型體設施，面對龐大的分析工作量，如何強化表型分析技術及分析量能，為突破表型領域解釋性瓶頸之重點。