

正瀚生技創新獎

CH BIOTECH INNOVATION AWARD

第四屆表揚實錄



■ 獎項簡介暨評選紀要

■ 青年學者獎

微生物的生態基因體學 蔡怡陞 01-08

■ 基礎理論組

首獎 單細胞轉錄體學揭開植物木質部的發育及演化 董家均 09-15

銀獎 咖啡因增強蜜蜂大腦之cAMP訊號傳遞以提升能量代謝與神經活性 呂昀恆 16-21

銅獎 以比較多體學分析發現含羞草屬葉枕表現基因參與快速運動之基因革新 方彥涵 22-27

新銳
潛力獎 野生綠豆對斜紋夜蛾抗性及其生物防治潛力 陳怡如 28-32

■ 應用創新組

首獎 建立結合ATP再生之耦合酵素系統生產類黃酮磷酸酯 蔡欣亞 33-39

銀獎 多功能生物防治菌*Streptomyces griseorubiginosus* LJS06的鑑定與其防治胡瓜炭疽病的特性 蔡健浩 40-45

銅獎 利用多重插補法分析臺灣毛豆種原遺傳歧異度與核心收集之建立 黃彥翔
陳令瑜 46-51

新銳
潛力獎 應用深度學習方法於茶菁影像識別及其分級系統之開發 王鼎慈 52-56

■ 正瀚生技創新獎辦法 57-60

■ 正瀚生技股份有限公司 61-65

■ 頒獎花絮 66-72

獎項簡介暨評選紀要

拔擢獎勵優秀青年從事農業生物科技研究之傑出人才，可激盪科技創新與深入的探索，尤其對於學術研究表現卓越的在學研究生與青年學者，其成果表現能獲得肯定及表彰，將有助於提升我國學術研究的動能。本獎項自2019年開始辦理，迄今已辦理四屆。

初始以「實驗」與「試行」的方式推動，徵件對象僅侷限於當年度臺灣大學生命科學與農業領域的在校生，總獎金為新台幣伍拾萬元，試辦成果頗受好評。在國立臺灣大學生物資源暨農學院院長盧虎生主任委員的建議下，正瀚生技公司董事長吳正邦決定擴大辦理第二屆正瀚生技創新獎，徵件對象擴及全國各大學農業生技領域相關科系在校生。

為兼顧「理論研究」與「實務應用」的均衡發展，第二屆正瀚生技創新獎規劃設置「基礎理論組」與「應用創新組」兩組；當年報名參賽者相當踴躍，優秀作品難於割捨，正瀚生技公司本著鼓勵莘莘學子深耕農業生技領域的初心，經評審團討論後決定於原本「基礎理論組」與「應用創新組」各四個大獎之外，增設「優等獎」與「佳作」數名，總獎學金額達壹佰零柒萬元。

第三屆評審委員會召集人黃振文終身特聘教授(原任國立中興大學副校長)依循正瀚生技創新獎設立之宗旨，為激勵台灣學術研發人才的研發動能，特將獎項獎勵對象拓展至得獎者的指導教授，並增列「青年學者獎」，期能更全面的鼓勵農業生技領域的研發人才，頒發獎勵金高達壹佰肆拾肆萬元，為全台備受關注的農業生技獎項。本屆頒發的獎盃設計，融入正瀚註冊商標元素，以潔淨透亮的水晶為意象，肯定獲獎者追求農業生技創新的理念。

第四屆正瀚生技創新獎選拔作業，自2022年11月1日起，經評審委員會公告接受報名及邀請專家學者研究機構推薦人選，至2023年2月28日止，總計有來自全台二十五個學研單位、共三十二組師生申請參與競逐。為使評選能符合公開、公平之原則，以選出對基礎科學與創新應用有卓越貢獻之研發團隊，特請農業生技相關領域之學術單位首長及學者專家等7人成立評審委員會，負責召開評審會議進行申請案之初審及複審業務。

2022年3月9日進行初審會議，決議將基礎理論組9案、應用創新組18案及青年學者組5案，由評審委員就申請資料做分組審查，評審委員皆為相關領域極為出色且具多年教學經驗之學者專家，或是從事實際工作經驗豐富的企業先進，評審過程嚴謹、超然。初審結果再由評審委員會逐件審查，篩選出複審名單。

2022年5月22日舉行複審會議，複審名單之申請人，以現場為主進行簡報，若申請人提出於國外進行學術交流之事實，則准予視訊方式簡報，經由評審委員會委員逐一詢答、謹慎審議後，評選出獲獎人選，本次三組共計有19名獲獎者，並於2023年7月20日舉行頒獎典禮。

青年學者獎



青年學者獎

蔡怡陞

研究專長

遺傳學、基因體學、真菌學、
寄生蟲學、微生物生態學

學歷

倫敦帝國理工學院 / 生物學博士
倫敦帝國理工學院 / 生物資訊碩士
諾丁漢大學 / 生化與遺傳學士

經歷

中央研究院 研究員
中央研究院 副研究員
中央研究院 助研究員
宮崎大學 (日本) 博士後研究
Wellcome Trust Sanger Institute
(英國) 博士後研究 2009.12-2012.12

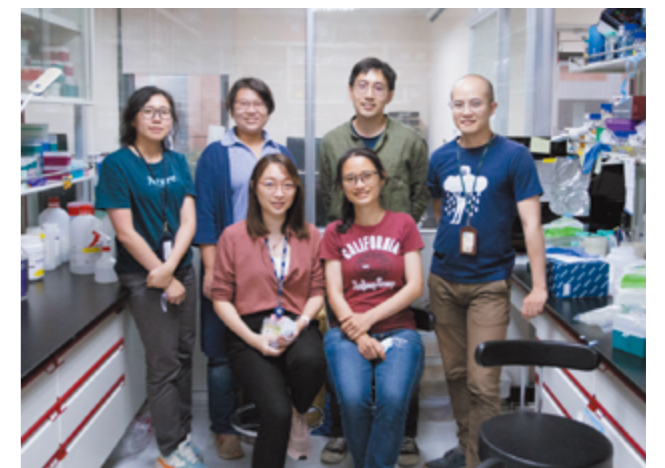


服務單位

中央研究院生物多樣性研究中心

實驗室目前成員

劉育菁	Yu-Ching Liu
蕭楨	Chen Hsiao
陸敏	Min Lu
孫沛煒	Pei-Wei Sun
簡維庭	Wei-Ting Chien
孫培峰	Pei-Feng Sun
李宜謙	Yi-Chien Lee
林婕蘋	Chieh-Ping Lin



微生物的生態基因體學

Ecological genomics of microorganisms

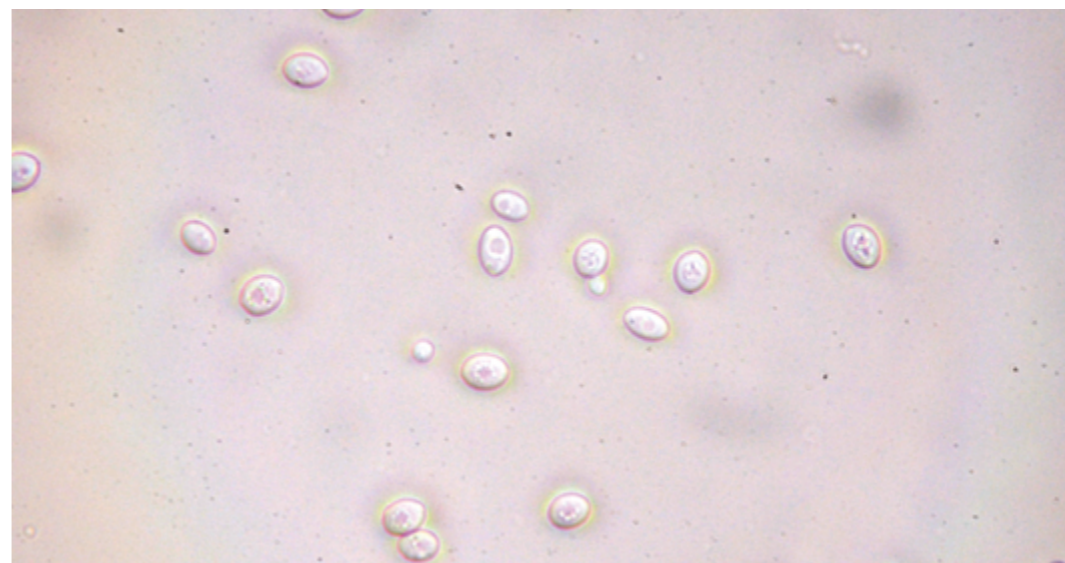
研究論文內容

蔡怡陞研究員大學時攻讀生物化學以及遺傳學，深入研究酵母菌及寄生蟲至今將近20年。申請人於2010年獲得倫敦帝國理工生物系博士學位後，在維康桑格研究所(Wellcome Trust Sanger Institute)以及日本宮崎大學總共進行四年的博士後研究，並且隨後任職於中央研究院生物多樣性研究中心。團隊近年來致力於以新興科學方法探討遺傳演化學，主要研究為利用最新定序技術產生的巨量基因體、轉錄體及總體基因體資訊來分析物種間以及族群的保守性和變異。研究範圍著重於與林業及農業相關的生物，在台灣生態環境上有重要地位之物種和病原尤甚，透過其基因體鑑定物種特定表型或是探討致病性的機制與演化。最終目標為了解、保護、永續利用微生物的生物多樣性。

申請人在台灣中央研究院的團隊已經建立八年有餘，受中研院、國科會、國衛院等機構的研發經費補助，至今發表七十多篇期刊論文，包含Nature、Science、Nature Genetics、Nature Communications、Nature Plants、Nature Microbiology、Nucleic Acid Research、PNAS、Genome Research、Genome Biology、Molecular Ecology等。被引用次數總計為7155次，H-index為30。彰顯研究團隊具備極高的生產力以及在台灣從事基因體資料分析的獨立性。申請人目前也持續積極參與許多大型國際合作計畫，並在國際上開始享有名聲。其於2019年獲選為歐洲分子生物組織(EMBO)第一屆全球研究學者(Global Investigators)中九位之一。而2020年底受邀成為分子生態學(Molecular Ecology)及分子生態資源(Molecular Ecology Resources)副主編，2022年底亦受邀成為酵母菌(Yeast)期刊副主編。近期更獲得國科會2030國際年輕傑出學者補助。



分離酵母菌



酵母菌

台灣生態環境關鍵物種基因體研究

研究團隊參與數種生態、農業、林業及保育相關之重要真菌及樹木的基因體研究，且將各項研究成果發表在科學期刊。譬如：團隊耗時約六年的時間至台灣各闊葉森林採樣，分離並成功定序一百多株釀酒酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae*，顯示釀酒酵母在台灣有極高的基因多樣性，並證明東亞地區包括台灣為釀酒酵母的發源地 (Lee et al., 2022 Genome Research)。研究團隊也與東吳大學微生物學系的柯惠棉助理教授合作，發表全球第一個小菇支系 *Mycena* 完整的基因體，亦是全球第一篇探討真菌發光基因演化的學術文章 (Ke et al., 2020 PNAS)，並以在台灣拍攝的螢光小菇照片登上期刊封面。研究團隊這幾年持續地從台灣闊葉森林落葉樣本中分離出400多種酵母菌菌株，代表了24個屬和59個物種的驚人多樣性，其中優勢種包括 *Candida*、*Kazachstania*、*Lachancea* 和 *Hanseniaspora*。其中還包括可能的新的酵母菌種，突顯了台灣森林真菌中隱藏的廣泛基因多樣性。

此外，團隊與台灣大學植物病理與微生物學系鍾嘉綾教授合作，2017年首次定序引起樹木褐根病的有害木層孔菌 (*Phellinus noxius*) 及另三種近緣真菌基因體，探討 *P. noxius* 可能的致病遺傳機制，及褐根病在台灣及日本離島的傳播途徑。分子證據顯示，*P. noxius* 的短距離傳播以鄰近樹木的根和根接觸傳染為主，長距離散播則與子實體產生的擔孢子飛散或人類活動 (如染病植株或殘體之遷移) 有關。分析臺灣各地及日本離島的 *P. noxius* 族群後發現：日本琉球群島的菌株可能源自臺灣，而距離遙遠的小笠原群島的菌株則有不同來源及演化趨勢。這些結果可望提供研究此類真菌病原特性的新基礎 (Chung et al., 2017 Molecular Ecology)，奠定近期樹木褐根病之病地生物復育技術。



螢光菇登上PNAS期刊封面





利用野外酵母菌釀酒

體認到台灣生態特有物種的基因體研究落後模式物種許多，申請人及其團隊致力於開發更新的生物資訊方法，期望能夠處理並分析更複雜基因體的資料 (Tsai et al., 2013 Genome Biology; Liu et al., 2018 BMC Bioinformatics)，或是結合全基因體增幅 (whole genome amplification) 和長片段定序的方式從少量DNA進行定序並組裝完整的基因體 (Lee et al., 2023, Nucleic Acid Research)。

分析與實驗方法的精進，不僅提升研究效率，也提供國內更多的研究團隊進行應用。實驗室團隊參與生物多樣性研究中心趙淑妙特聘研究員執行的牛樟基因體計畫，為台灣第一個木本植物的基因體發表 (Chaw et al., 2019 Nature Plant)。此研究探討牛樟樹具抗蟲、耐腐、長壽特性的生物機制，並建立木蘭屬跟真單子葉和真雙子葉的親緣關係，解開研究者長期未解的植物演化謎題。此基因體的完整性提供開發新分子標誌時的所需資訊，用以研究台灣野生牛樟的多樣性，有利於進一步的生態保育。



福山森林動態樣區採集



東沙林投林採集土壤

總體基因體學 (Metagenomics)

越來越多的研究發現腸道微生物菌群與人類健康密切相關，甚至為重要疾病的原因。2016年，申請人獲得國家衛生研究院的Career development fellowship，與長庚醫院謝森永醫師與宋昌穆醫師專注於兩種疾病的腸道菌項分析：肝性腦病急性發作 (AHE; acute hepatic encephalopathy)，一種由肝臟代謝功能失調導致的嚴重中樞神經功能障礙，和潰瘍性結腸炎 (ulcerative colitis)。

團隊將樣品製備和數據標準化，以便在臨床上困難取得樣品中產生可重復的結果。在AHE研究中，申請人團隊找出兩種與疾病發展有關的細菌 (Sung et al., 2019 Cell Mol Gastroenterol Hepatol; Lin et al 2020 Gut Microbes)，更重要的是能夠預測臨床結果，並且預測疾病的復發。這些結果有助於後續研究深入了解這兩種疾病的機制。

實驗團隊也利用了擴增子 (Amplicon) 定序的方式，發現馬來西亞針對瀕危海龜孵化場管理方式的不同會影響環境中病原菌鐮孢菌複合種 (*Fusarium solani species complex*) 的含量：在管理方式不佳的孵化場有顯著較高的病原菌。這些結果成為建議馬來西亞NGO如何選擇管理方式的直接證據 (Hoh et al., 2020 Fungal Ecology)。鐮孢霉病已被認為是一種新興並且嚴重的真菌傳染病，並可能會導致宿主種群的喪失和滅絕。團隊更進一步研究茄鐮孢菌複合種對於重要保育動物的感染機制，首次揭開海龜蛋鐮孢霉病的神秘面紗 (Hoh et al., 2022 BMC Biology)。此外，無論宿主物種為動物或植物，研究團隊已公開的高質量茄鐮孢菌基因組為致病機制的相關研究提供了重要參考資訊，盼能進一步探究，讓更多的小海龜健康孵化。



鑑定有病徵的海龜蛋

真核病原寄生及感染宿主之機制

申請人亦與世界頂尖研究組織攜手合作，從演化遺傳角度來瞭解寄生蟲多樣性 (Tsai et al., 2013 Nature)。由於台灣為熱帶醫學研究的發源地之一，與國際合作研究這類獨特的熱帶寄生蟲感染疾病，是為難得而有意義的成果。舉例來說，實驗室發現寄生線蟲有相對其他相近物種較多的SCP/TAPS基因家族 (Hunt and Tsai et al., 2016 Nature Genetics)，而親緣關係較遠的鉤蟲及血吸蟲，也具有此類基因，且直接參與寄生宿主的機制，被認為是有潛力的目標疫苗，吸引了相當的醫藥投資。因此在動物性寄生線蟲的感染機制尚未被完全了解時，借鏡相關領域已有的成果，來協助發展新的疫苗與防疫策略。這影響了國際上研究線蟲與其它寄生蟲的領域。近年來，申請人集中在植物性線蟲的基因體以及感染機制之研究，如松材線蟲 (Kikuchi et al., 2011 PLOS Pathogens; Tsai et al., 2015 Molecular Plant Pathology) 和與中興大學植物病理學系陳珮臻教授合作葉芽線蟲的基因體組裝 (Lai et al., 2023 Molecular Ecology Resources)。



實驗室一角

研究創新性與貢獻度

研究團隊專精於演化學和生態學的交叉領域，並在酵母菌和寄生蟲的生態系統上進行深度研究，其成果顯著。基於東亞獨特的生物或環境，針對重要生態、農業、林業及保育的研究，不僅能讓台灣的基礎研究扎根，亦能成為國際所肯定的研究重點。團隊的重要貢獻在於產出精確且完整的基因體，這些基因體資訊將成為國際研究的重要資源或是參考依據，進而提供未來研究的應用跟藍圖。研究創新性包括以下幾個重點：

- 1 研究團隊為野生酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 的生態學和人類馴化之前的生態提供了新的視野。研究結果確認 *S. cerevisiae* 在自然界中具有豐富的多樣性，並且能夠避免人類活動的干擾。這些發現 *S. cerevisiae* 成為微生物生態學研究中的重要模型。我們全面的真菌收集對各種領域具有重大潛力，特別是在釀造產業，引入新的酵母菌可能會解鎖獨特的風味或改進過程。因此，我們的研究不僅提供了新知識，也提供了從環境分離的生物資源。
- 2 研究結果也為生物發光途徑的應用研究提供額外的資訊，對於真菌生物發光在生態學中的角色提供了深入的理解，並同時對真菌基因體科學和蘑菇演化歷史有顯著貢獻。關於探討蕈類調控發光的機制、目的及意義的研究將可全面進行。持續探索這些蕈類的基因體，有助於提升生物資源的利用。
- 3 研究團隊近年來填補了關於亞洲真菌病原體演化和傳播途徑的資訊遺漏，這些部分在過去可能被忽視，如褐根病和海龜蛋鐮孢霉病。透過對這些病原體基因體的深入了解，能夠制定出更有效的疾病控制方法和保護策略。同時，研究團隊也為真菌病原體建立了一個包含基因體資源和跨界宿主的動物模型。
- 4 研究團隊對腸道菌相的相關研究有利深入探索台灣的AHE或UC患者的微生物群，這兩類人群過去往往被忽視。研究不僅支持了微生物群對疾病進程有重大影響的增長證據，同時也預測了可能的臨床結果，提出了新的預防和治療復發疾病的策略。
- 5 研究團隊成功利用基因體增幅技術 (MDA)，有效擴增DNA與mRNA，從而突破因生物來源限制而困難的基因體組裝挑戰。研究結果展示了使用MDA來研究線蟲門 (Nematoda) 和其他相關生物群基因體多樣性的實用性。詳細方法為所有曾因為樣本取得困難，而被視為無法研究的基因體，提供了一種強大的解決方案，並可用於任何未被深入研究的物種。





基礎理論組 獎項



董家均

就讀學校

國立臺灣大學 生命科學系 博士班

指導教授

林盈仲 副教授



研究共同作者

郭尚哲	Shang-Che Kuo
楊佳陵	Chia-Ling Yang
余中合	Jhong-He Yu
黃家恩	Chia-En Huang
劉品謙	Pin-Chien Liou

孫英玄	Ying-Hsuan Sun
帥鵬	Peng Shuai
蘇溶真	Jung-Chen Su
顧銓	Chuan Ku
林盈仲	Ying-Chung Jimmy Lin



單細胞轉錄體學揭開植物木質部的發育及演化

Single-cell transcriptomics unveils xylem cell development and evolution

研究論文內容

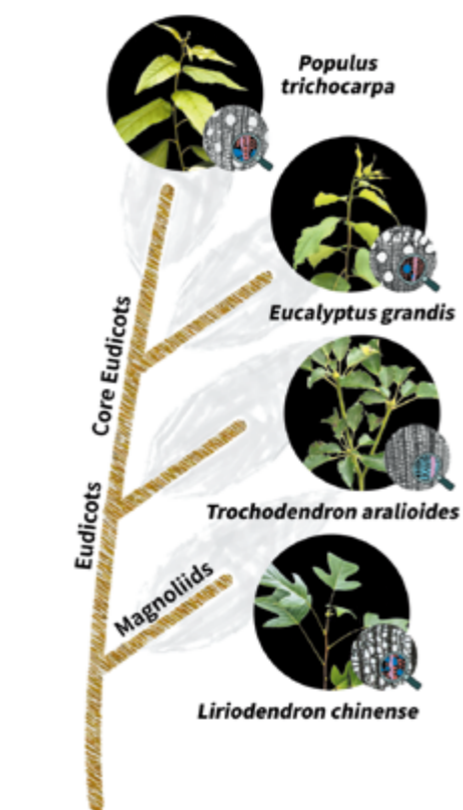
日常生活中處處可見的木材，是人類重要且不可或缺的自然資源。根據聯合國糧食及農業組織（FAO）在2022年的年度報告，森林產業在2015年貢獻了高達1.52兆美元的產值，是2%世界國內生產毛額。木材是由木質部細胞經過細胞膨脹、細胞壁加厚以及計畫性細胞死亡的發育過程累積而成。

植物木質部也是地球上含量最為豐富的生物組織，它肩負著從根部運輸水分至植物體各部位的責任，同時也提供支撐力，讓植物得以「站立」並向空中生長，也是樹木能夠聳立於地表的關鍵。因此，植物如何調控木質部的發育，以及木質部自古至今是如何演化而來，皆是植物學家們極力探究的問題。大部分的被子植物中，木質部包含負責支撐功能的纖維細胞（libriform fibers）、運輸水分的導管細胞（vessel elements）及負責橫向運輸的射線薄壁細胞（ray parenchyma cells）；而少數的被子植物，則是以管胞（tracheids）取代纖維細胞和導管細胞，同時執行兩者的功能。我們的目標是透過木質部單細胞轉錄體結合植物解剖學的資訊，以跨物種的角度解開木質部細胞發育和演化的謎團。

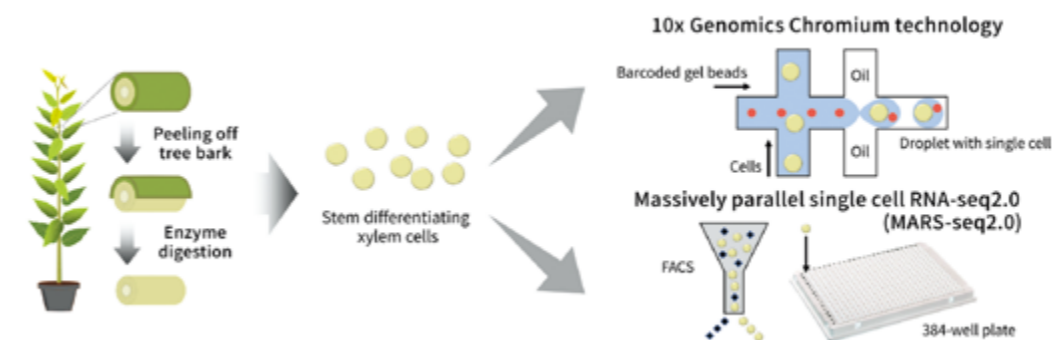
我們使用四種木本植物為研究材料（圖一），一為薔薇類金虎尾目的毛果楊（*Populus trichocarpa*），是第一個基因體被解序的木本植物；二為桃金娘目的玫瑰桉（*Eucalyptus grandis*），和毛果楊皆屬於核心真雙子葉植物，兩者的木質部中皆具有纖維細胞、導管細胞和射線薄壁細胞；三為屬於早期被子植物木蘭類的鵝掌楸（*Liriodendron chinense*），在解剖學的定義上亦具有三種木質部細胞。

原生於臺灣的昆欄樹（*Trochodendron aralioides*）雖屬於真雙子葉植物，與毛果楊和玫瑰桉之演化距離較鵝掌楸為近，但其並不具有纖維細胞和導管細胞，而是以管胞執行支撐和輸水的功能，且由於這樣的特徵在解剖學上和裸子植物較為相似，因此也被稱為一「逆演化」之物種。因昆欄樹在地理及演化上的特殊地位，我們的研究亦納入昆欄樹作為研究材料。

我們利用團隊先前發表的木質部原生質體系統抽取出分離的木質部細胞，並進行單細胞測序（圖二），再結合生物資訊運算出細胞發育的軌跡。



圖一、本研究使用之四種木本植物及其木質部解剖圖。由上至下為毛果楊、玫瑰桉、昆欄樹與鵝掌楸。紅色細胞為纖維細胞，深藍色細胞為導管細胞，粉紅色細胞為射線薄壁細胞，淺藍色細胞為管胞。



圖二、本研究使用兩種方法進行單細胞測序。

我們將毛果楊和鵝掌楸的莖段外皮剝除後浸入酵素液中，待酵素分解細胞壁後將木質部細胞的原生質體分離至等張溶液中，並使用10x Genomics Chromium平台進行單細胞轉錄體的建庫及測序，之後利用10x Genomics公司開發的Cell Ranger軟體初步分析資料。

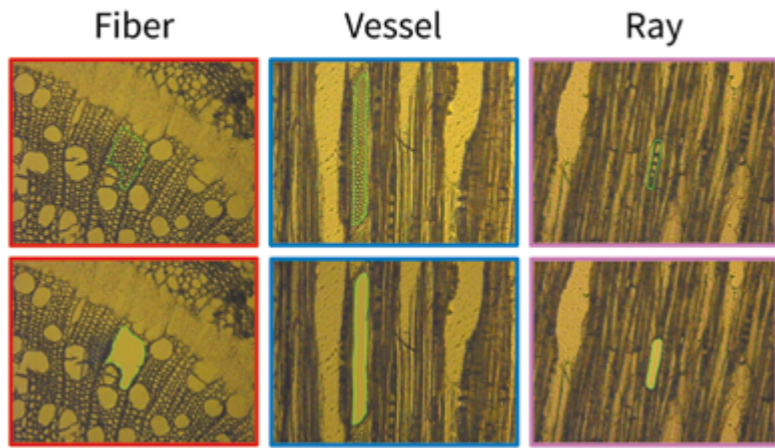
玫瑰桉和昆欄樹在分離木質部細胞原生質體時，遇到雜質過多而導致細胞純度過低的問題，推測可能是樹種本身帶有較多次級代謝物，或是由於生長於野外環境的關係，以致玫瑰桉和昆欄樹無法順利使用10x Genomics Chromium的技術進行單細胞測序，若強行使用除了可能發生機器管柱堵塞的問題，也會因為油滴包裹到過多的雜質，降低單細胞定序的細胞回收率。

為了解決細胞純度過低的問題並提高單細胞定序的效率，我們和中研院植物暨微生物學研究所的顧銓博士合作，先使用FDA (Fluorescein diacetate) 染色區別活細胞，並以細胞分選儀分離原生質體，再利用MARS-seq2.0的技術和分析流程，成功解決了細胞純度的問題並獲得玫瑰桉和昆欄樹的單細胞轉錄體資訊。

另外，為了解決木本植物的木質部細胞沒有標記基因可用的問題，我們耗時半年以上，利用冷凍切片將毛果楊莖段的橫切面與縱切面切成薄片後，再利用雷射顯微切割技術（laser capture microdissection）分別切取纖維細胞、導管細胞和射線薄壁細胞（圖三），抽取其RNA後，進行短片段測序以獲得三種細胞的轉錄體，並和單細胞定序結果結合後，標定各群單細胞轉錄體的細胞種類。



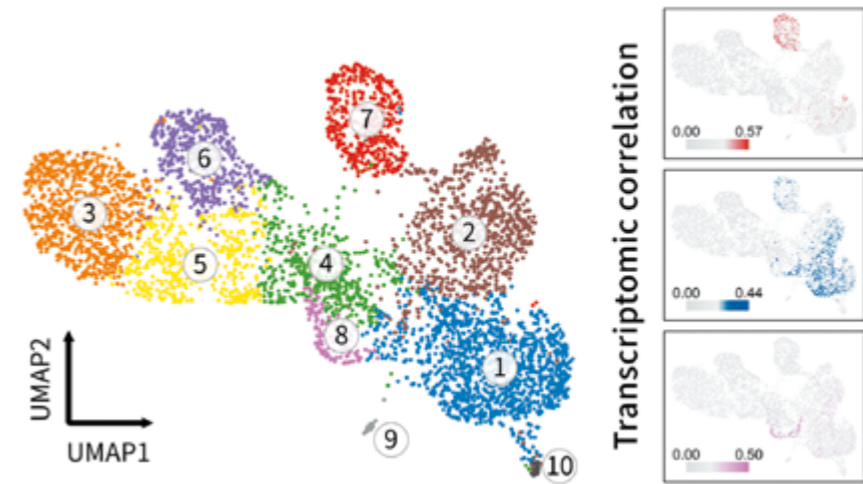
Laser microdissection



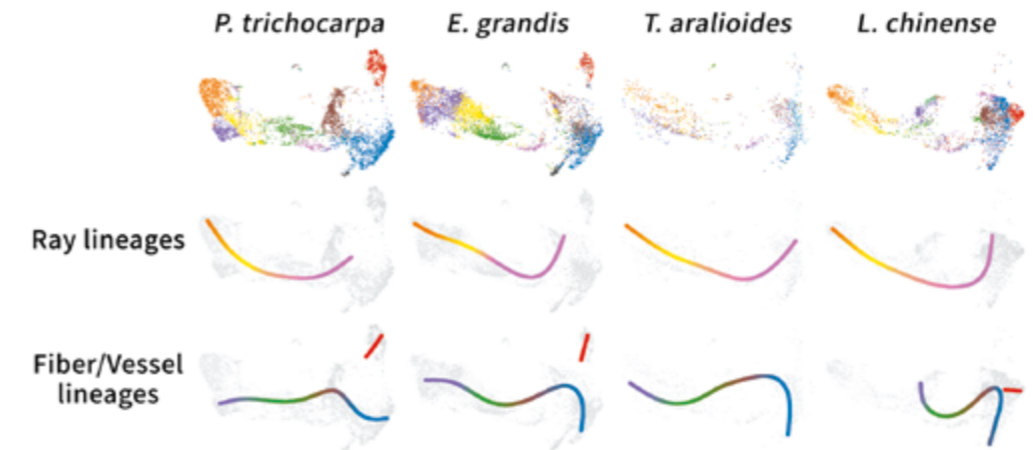
圖三、毛果楊木質部雷射顯微切割。由左至右分別為纖維細胞、導管細胞、射線薄壁細胞之雷射顯微切割前（上排）與切割後（下排）之實際切面圖。

我們一共擷取到4705個毛果楊木質部細胞的轉錄體，並將細胞依照轉錄體的差異分派至10個不同細胞群中（圖四），接著將單細胞定序的結果和雷射顯微切割所得到的三種木質部細胞轉錄體進行相關性分析，成功定義出紅色7號細胞群為纖維細胞，藍色1號細胞群為導管細胞，粉紅色8號細胞群為射線薄壁細胞（圖四）。

在玫瑰桉、昆欄樹及鵝掌楸，我們分別擷取到5494、1993及2977個木質部細胞的轉錄體，並透過跨物種整合分析，將四種木本植物之單細胞轉錄體相互疊合後，按照物種將細胞分開觀察（圖五），結果顯示：射線薄壁細胞之發育軌跡在四個木本植物中非常相似，代表射線薄壁細胞之發育具有一定程度的演化保守性；而無論是纖維細胞或是導管細胞的細胞發育軌跡，在演化距離最近的毛果楊和玫瑰桉皆非常相似。另外，也可以發現昆欄樹的管胞則較相似於核心真雙子葉植物的導管細胞而非纖維細胞，推測輸水功能相較於支撐功能，演化上是由較為保守的機制所調控。而演化距離較其他三種木本植物為遠的鵝掌楸，雖然和毛果楊、玫瑰桉有相似的細胞型態，但發育軌跡卻異於核心真雙子葉，因此我們推測兩種可能的調控機制：第一種可能為木質部細胞的分化是由少數關鍵基因調控，因此在整體轉錄體與核心真雙子葉相異的情況下，仍能分化出相同的細胞種類；第二種可能為趨同演化下所造成的結果。我們的研究在單細胞層級上為被子植物的木質部提供了更完整的視野。期待以我們的研究結果做為基石，未來亦能夠進一步探討整體植物界中維管束發育的演化歷程。



圖四、毛果楊單細胞分群與三種木質部細胞轉錄體之相關性分析。



圖五、毛果楊、玫瑰桉、昆欄樹與鵝掌楸之跨物種木質部細胞轉錄體整合結果。Ray lineages，射線薄壁細胞之發育軌跡。Fiber/Vessel lineages，纖維細胞與導管細胞之發育軌跡。



研究創新性與貢獻度

- 1 木質部單細胞測序之穩定度提升：
在分離木質部單細胞時，細胞溶液常會伴隨大量雜質，降低整體測序的品質和效率。為了提升測序品質，本研究結合了流式細胞分選 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS) 和 MARS-seq2.0測序平台，先將細胞進行螢光標定純化，再以細胞為單位進行建庫和高通量測序，進而達到測序穩定度的提升。
- 2 細胞分群註解之新手段：
為了辨認單細胞測序結果中，不同細胞的原始類型為何，本研究利用雷射顯微切割技術，收集木質部不同細胞類型的轉錄體資訊，以做為細胞分群註解的正確解答。
- 3 木本植物木質部發育之新見解：
本研究揭開了三種木質部細胞的生長發育軌跡，並發現纖維細胞與導管細胞，在細胞發育的早期走在相同的路徑上；至於射線薄壁細胞，則是自始至終走在另一條獨立的發育路徑。更重要的是，本研究的發現釐清了前人對於木本植物木質部發育的誤解。
- 4 木質部細胞發育之演化保守性：
透過結合毛果楊、玫瑰桉、昆欄樹、鵝掌楸的單細胞測序結果，更進一步發現，木質部細胞的發育軌跡，在木本植物的演化洪流中，存在著高度的演化保守性。
- 5 植物木質部未來研究之重要研究基石：
本篇研究，除了提供跨物種以及細胞層級的木質部細胞發育知識，更建立一套植物木質部發育的研究新策略。

基礎理論組 銀獎

呂昀恆

就讀學校

國立臺灣大學 昆蟲學系 研究所

指導教授

吳岳隆 教授

研究共同作者

呂昀恆 Yun Heng, Lu
吳岳隆 Yueh Lung, Wu



咖啡因增強蜜蜂大腦之cAMP訊號傳遞以提升能量代謝與神經活性

Caffeine promoted energy metabolism and neural activity in honey bee's brain through the enhancement of cAMP signaling pathway

研究論文內容

咖啡因為咖啡屬 (*Coffea*)、柑橘屬 (*Citrus*) 等植物自然產生之次級代謝物，主要被累積在葉子、種子等處，濃度約為5mM以上，目的為抵禦植食性動物的取食。然而，咖啡因也被發現存在於花蜜中，且濃度較低，大部分不超過300μM，這樣低濃度的咖啡因會被重要的經濟昆蟲—蜜蜂在訪花的過程取食，因此咖啡因對蜜蜂造成什麼樣的生理或行為的影響，便成為了有趣的議題，如果咖啡因對蜜蜂其實有生理上的好處呢？那或許我們有機會將咖啡因這個天然物質運用在養蜂產業乃至於提升授粉效率！為此，我們著手探索咖啡因對蜜蜂生理的作用機制。

前人研究證實，咖啡因能夠增強蜜蜂的長期記憶能力，並推測是因為咖啡因阻斷了腺苷受體 (adenosine receptor, AdoR) 與其ligand腺苷 (adenosine, Ado) 的接合，與對哺乳動物的效果類似。然而在我們探索了蜜蜂的AdoR後，發現了矛盾，因為在我們近期的研究發現Ado亦可以增強蜜蜂的長期記憶，換句話說，咖啡因可能阻斷了Ado-AdoR的互動，卻與Ado一樣能增強蜜蜂的長期記憶，這暗示了咖啡因的機制暗藏玄機。

我們決定先觀測咖啡因對蜜蜂的AdoR造成什麼影響，透過量測二次信使cAMP的量變化，得知咖啡因究竟是刺激或是抑制AdoR的下游訊號傳遞。我們將這個cAMP的測定實驗分成兩個部分，一個部分針對中國倉鼠卵巢細胞 (CHO cells) 大量表現蜜蜂的AdoR；一個部分是直接針對蜜蜂大腦。前者可以相當專一的觀察AdoR與不同化學處理的互動，同時排除其他潛在受體的干擾；後者可以更直接去模擬蜜蜂腦內真實的生理狀況。

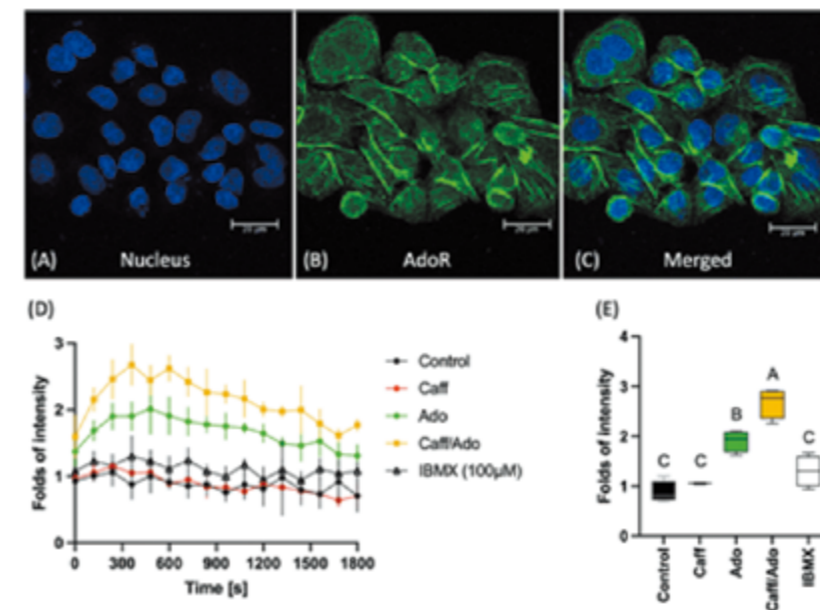
細胞實驗的部分，結果顯示當咖啡因與Ado同時施加於AdoR，能刺激cAMP的累積，程度更甚Ado單獨處理(圖一D)，顯示咖啡因與Ado並非單純的拮抗關係，而可能有「協同作用 (Synergistic effects)」，基於這個前提，我們假設咖啡因的處理，配合蜜蜂大腦本身就具有的內源性Ado，應該能提升大腦的cAMP累積量，而大腦實驗的部分證實了這件事情(圖二B)。

有趣的是，不論是咖啡因或是Ado，皆在不同濃度下造成了相反的結果，是為「雙相效應 (Biphasic effects)」，表示咖啡因對蜜蜂有刺激效果的濃度僅存在於某個特定的區間，觀測蜜蜂的長期記憶實驗證實了這一點(圖二E)。

接著，我們想知道咖啡因增強了cAMP累積後，是否啟動cAMP的訊號傳遞，並增強了蜜蜂大腦的神經活性。cAMP的訊號傳遞會啟動轉錄因子CREB與下游的基因表現，包含了糖解作用 (Glycolysis) 與三羧酸循環 (TCA cycle)，接著會增加能量貨幣—ATP的累積。

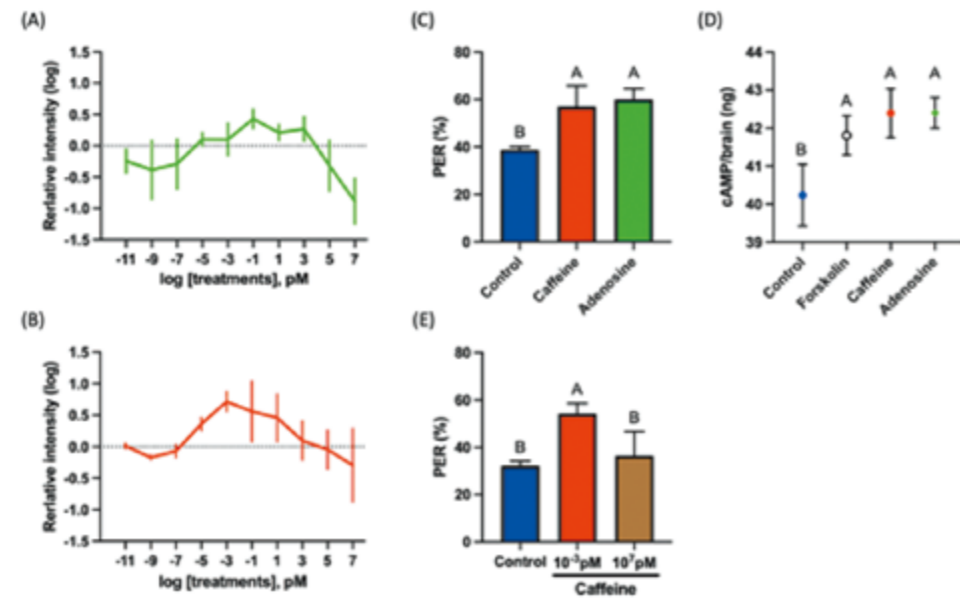
總結來說，我們發現咖啡因事實上與Ado在蜜蜂的AdoR有協同作用，而非單純的拮抗作用；這個情形讓咖啡因能在適當的濃度區間內，刺激蜜蜂大腦的cAMP累積量及其訊號傳遞，最終提升了ATP產量與神經活性，整體而言幫助蜜蜂獲得更強的長期記憶。換句話說，適量攝取咖啡因，能幫助蜜蜂提升能量代謝，這些能量我們認為並不只貢獻於記憶的形成，舉凡移動能力、抗病毒感染、抗微孢子蟲感染、抗細菌感染的效果，皆有前人研究已經證實，顯示咖啡因對於蜜蜂來說，有潛力成為一個添加物，幫助蜜蜂抵抗環境的壓力。

然而就近該如何使用咖啡因於養蜂，則是另一個研究主題，當然亦是我們的研究方向，搭配我們目前累積的個體生理的知識，期許未來的應用方式能更加明顯。

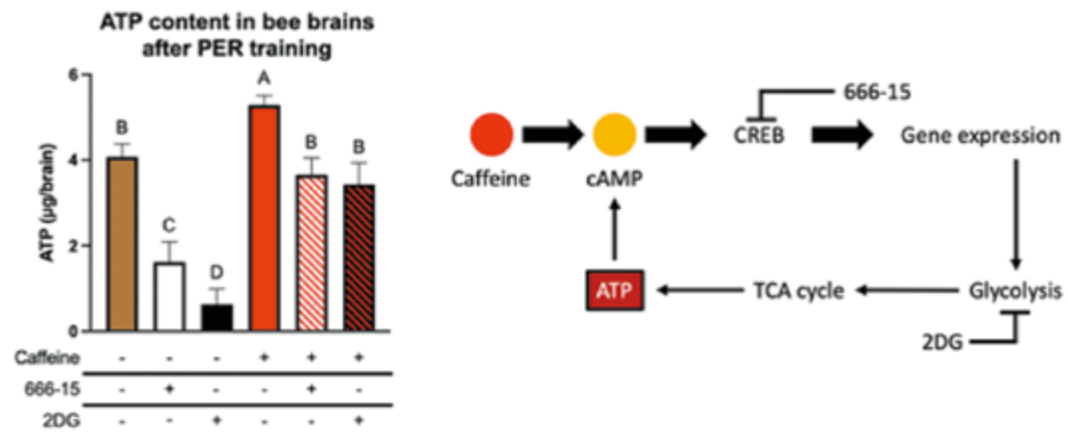


圖一、蜜蜂AdoR表現於CHO cells之細胞膜(圖一A~C)後，進行cAMP含量測定，每40秒紀錄一次cAMP之訊號(圖一D)，並選用第320秒(約為峰值)的訊號進行單尾ANOVA檢定(圖一E)。Caff: 咖啡因；Ado: 腺苷；Caff/Ado: 咖啡因與腺苷混合；IBMX: 磷酸二酯酶抑制劑。統計分析為單尾ANOVA與Tukey事後檢定，不同英文字母代表顯著差異。

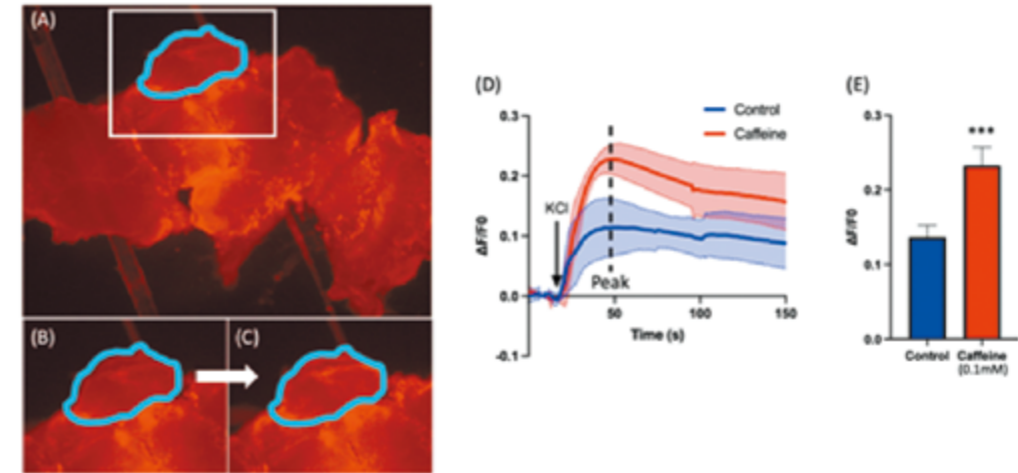




圖二、對蜜蜂大腦進行cAMP含量測定，發現不論是Ado (圖二A) 或是咖啡因(圖二B) 都能依據不同濃度增強或抑制cAMP的累積量，是為「雙相效應(Biphasic effects)」。這使得咖啡因與Ado在適當濃度下皆能增強蜜蜂的長期記憶(圖二C)，且蜜蜂大腦的cAMP的確顯著提升(圖二D)，而當咖啡因的濃度落在抑制的區間，則沒辦法增強蜜蜂的長期記憶(圖二E)。統計分析為單尾ANOVA與Tukey事後檢定，不同英文字母代表彼此具顯著差異。PER: Proboscis Extension Reflex，為古典制約，常被研究者用來代表蜜蜂的記憶能力，比例愈高代表記憶力愈好。



圖三、蜜蜂大腦之ATP含量測定。ATP屬於cAMP訊號傳遞路徑的其中一個產物，此路徑包含了轉錄因子CREB的磷酸化，以及糖解作用 (Glycolysis) 與三羧酸循環 (TCA cycle)(右側示意圖)，因此除了咖啡因的處理組別外，我們亦施加了666-15來抑制CREB的功能，還有2DG以抑制Glycolysis，確認咖啡因的確透過這個路徑增強了ATP的產量。統計分析為單尾ANOVA與Tukey事後檢定，不同英文字母代表顯著差異。



圖四、以鈣離子染色技術測試蜜蜂大腦之神經活性。以Rhod-2 AM染劑標定蜜蜂大腦中的鈣離子 (圖四 A~C)，在大約10秒處施加氯化鉀 (KCl) 以刺激大腦，並針對蕈狀體腦區 (藍色框範圍) 測量鈣離子訊號隨時間的變化 (圖四 D)，將不同處理之訊號高峰的時間點單獨出來做統計分析 (圖四 E)。統計分析為單尾Student' s t-test，***代表 $p \text{ value} < 0.005$ 。



研究創新性與貢獻度

這個研究是第一次以蜜蜂為材料探討咖啡因的作用機制，相較於哺乳類系統複雜的多種AdoR互動，蜜蜂僅擁有一種AdoR，而這個AdoR的特性已經被我們的研究確認。接著，咖啡因與Ado的協同作用與雙向效應亦是第一次在蜜蜂發現，這些效應可以用來解釋咖啡因為什麼能幫助蜜蜂獲得更好的生理代謝效率，以至於影響行為表現。我們發現cAMP的含量會隨不同濃度咖啡因有上升或下降的趨勢，且我們也證實cAMP的訊號傳遞、下游生理反應與行為表現皆會受到咖啡因的影響，因此cAMP有潛力能成為判斷蜜蜂個體是否獲得適當濃度咖啡因的指標，未來當咖啡因真正運用於養蜂產業，這個指標能在實驗的過程中，幫助確認咖啡因的使用適當。

咖啡因是天然的化合物，在人類的生活亦普遍存在，近期也已經有利用咖啡因訓練熊蜂以提升特定作物的授粉效率的報告，相信利用咖啡因或其類似物於養蜂與農業上，會是一個充滿創造力的領域，而我們的研究提供了未來所需的蜜蜂生理與行為的知識，為未來的應用建立堅實基礎。

基礎理論組 銅獎

方彥涵

就讀學校

國立成功大學
轉譯農業科學博士學位學程

指導教授

黃兆立 副教授

研究共同作者

黃兆立 Chao-Li Huang



以比較多體學分析發現含羞草屬葉枕表現基因參與快速運動之基因革新

Comparative multi omics reveals the gene novelty of pulvinus expressed genes involved in the rapid movement of *Mimosa*

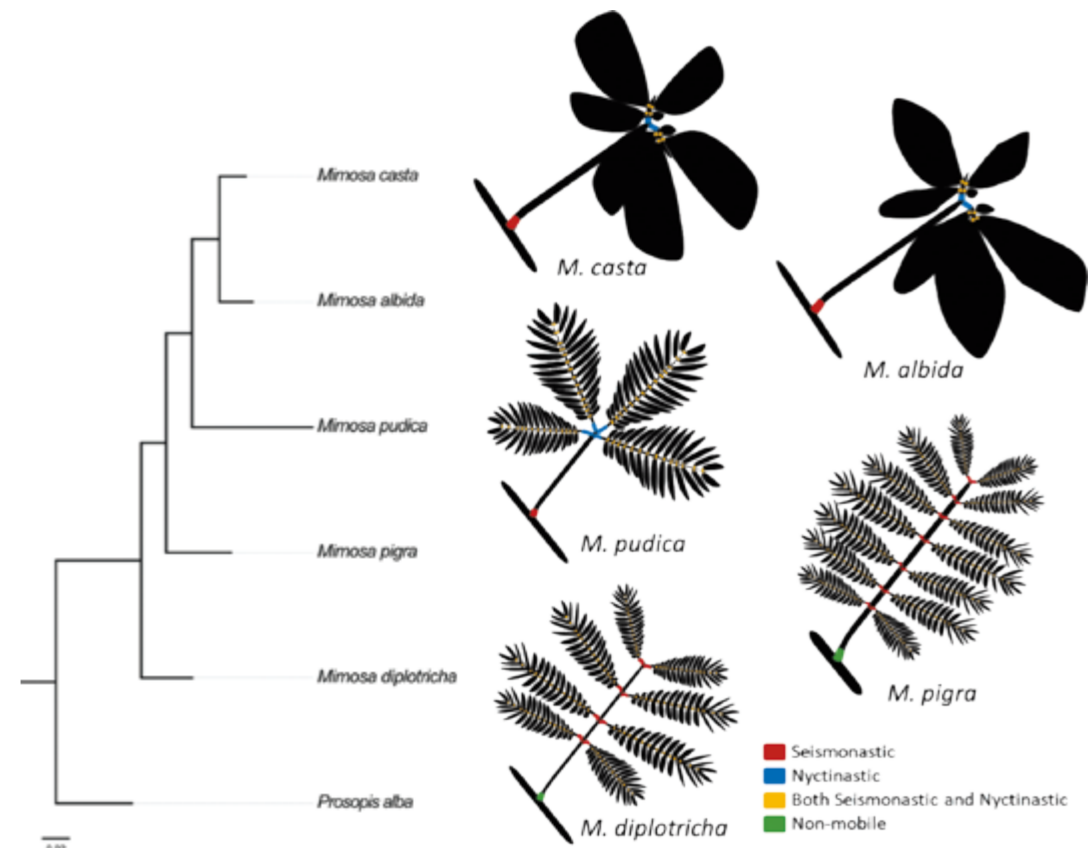
研究論文內容

含羞草屬 (*Mimosa*) 屬於豆科植物，同時擁有觸發運動 (seismonasty) 及睡眠運動 (nyctinasty) 能力，目前已知該屬物種之觸發運動能力皆不相同，但屬內遺傳變異與快速運動演化之關係尚未被探討。已知含羞草屬與豆科最近共同祖先都有睡眠運動的能力，因此我們好奇觸發運動能力是否為含羞草屬的共衍徵 (synapomorphy)？若否，含羞草是從什麼時候開始獲得觸發運動能力？

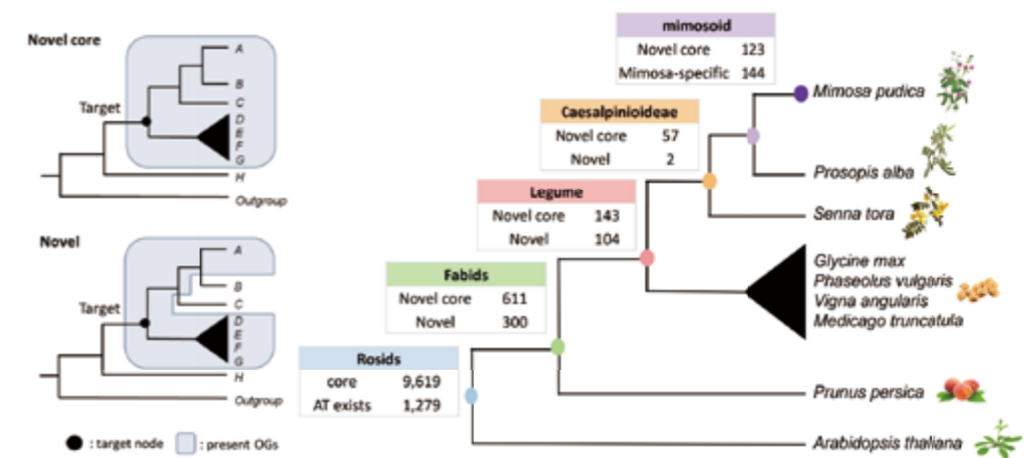
我們假設在豆科演化過程中曾發生基因革新事件，導致含羞草屬擁有觸發運動能力。由於其葉片運動是透過膨壓改變促使運動器官—葉枕 (pulvinus) 收縮或彎曲，因此我們比較分析五個具有不同葉片敏感程度的含羞草物種，分別為 *M. pudica*、*M. albida*、*M. casta*、*M. diplotricha* 以及 *M. pigra*，利用葉枕轉錄體探討快速運動基因的起源與演化歷程。

過去研究將兩百多個含羞草屬物種分為 24 個演化支 (A-X)，但僅將含羞草物種根據運動能力分為敏感 (sensitive) 及非敏感 (non-sensitive) 兩種類型 (Simon *et al.*, 2011)，而我們卻觀察到含羞草屬內物種具有不同的運動速度，因此有別於過去研究，我們將含羞草的葉枕分為四種類型，即「具觸發運動能力」、「具睡眠運動能力」、「具觸發及睡眠運動能力」以及「無運動能力」(圖一)。我們發現五個物種的小葉枕皆具有觸發運動及睡眠運動能力，並發現非敏感物種僅在副葉枕和小葉枕中表現出觸發運動能力，而敏感物種則分別在主葉枕和副葉枕中分別表現出觸發運動及睡眠運動。值得注意的是，分布在演化支 P 到 X 的物種 (*M. pudica*、*M. albida* 以及 *M. casta*) 能夠表現出更快速的觸發運動。我們總共鑑定出包含 52,080 個 *M. pudica* 基因的 17,056 個直系同源群 (orthologous groups, OG)。由於葉枕表現基因可能與觸發運動功能相關，因此我們使用雙向比對 (bidirectional best hit, BBH) 的蛋白質序列鑑定了含羞草屬轉錄組的同源基因對並得到共同表現於五個含羞草物種的 12,382 個葉枕表現同源基因。為了了解葉枕表現基因的起源，我們將這些基因依照起源時間分配至不同的譜系 (lineage)，並將其分為兩種類型 novel core 和 novel，這些基因大部分屬於薔薇類植物共有 (Rosid core) (9,619) 或與阿拉伯芥 (*Arabidopsis thaliana*) (1,279) 共有。豆目 (Fabid) 的 novel core 和 novel 基因分別為 611 個和 300 個，豆科 (Legume) 的 novel core 和 novel 分別為 143 個和 104 個。蘇木亞科 (Caesalpinioideae) 分別只檢測到 57 個和 2 個 novel core 和 novel 基因。含羞草支系 (mimosoid) 則分別鑑定出 123 個 novel core 基因和 144 個含羞草特有基因 (Mimosa-specific) (圖二)。

為了進一步探討這些含羞草特有基因的功能，我們進行基因本體 (Gene ontology, GO) 分析，發現這些基因多與運輸、滲透壓調節相關，例如 transferase activity (GO:0016740)、transmembrane transport (GO:0055085)、membrane (GO:0016020)、hydrolase activity (GO:0016787) 等，顯示這些含羞草特有基因與影響快速運動的分子機制，例如離子通道、跨膜運輸等皆有高度相關 (圖三)。

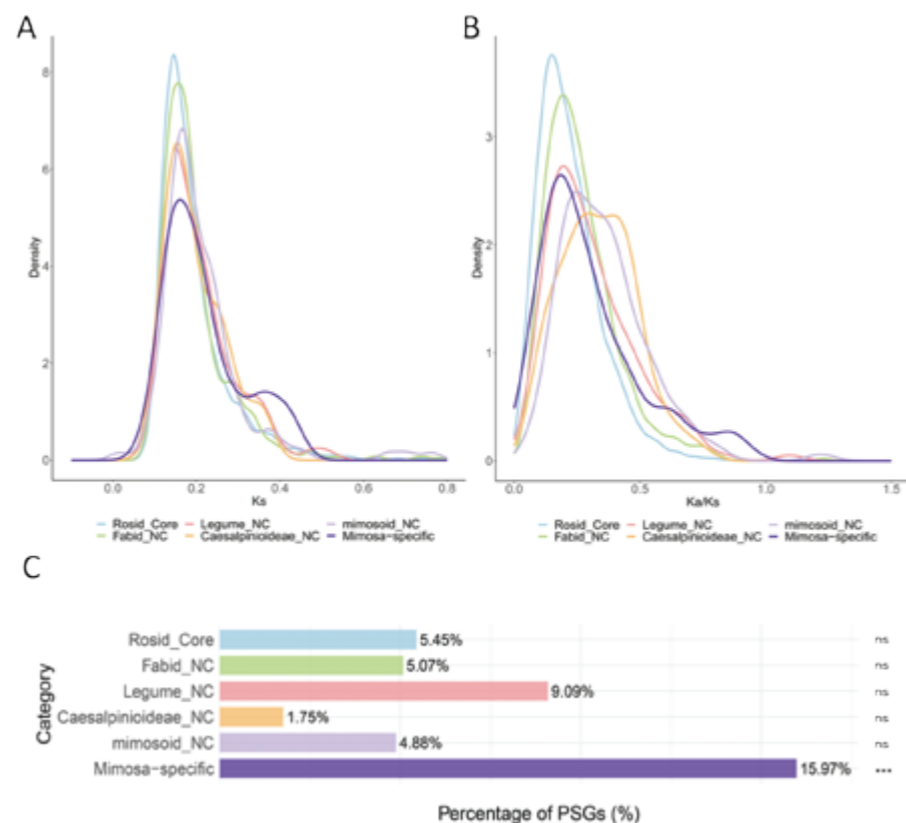


圖一、本研究選用之五個含羞草物種運動模式：依據各物種葉枕運動能力進行標示，紅色為「具觸發運動能力」(Seismonasty) 能力；藍色為「具睡眠運動能力」(Nyctinasty)；黃色表示「具觸發及睡眠運動能力」；綠色表示「無運動能力」。



圖二、各演化支之葉枕表現基因分布。共有12,382個葉枕表現基因，Core 為薔薇類植物共有；AT exists 為與 *A. thaliana* 共同擁有之基因；Novel core 代表該演化支共同演化之新基因；Novel 代表該演化支之新基因(非共有)；Mimosa-specific 代表以 *M. pudica* 篩選之含羞草屬特有基因。





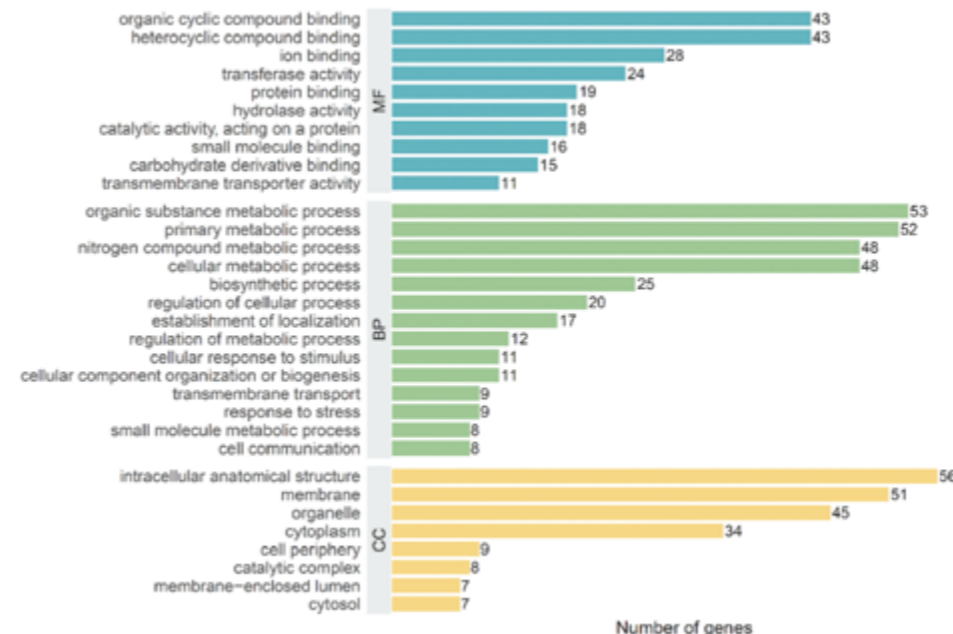
圖三、各譜系葉枕表現基因之演化足跡。A，各基因群同義置換率 (K_S)；B，異義置換率與同義置換率之比值 (K_A/K_S)，橫軸為置換變異率，縱軸代表該群基因密度。C，各基因群之正向天擇基因比例。 p -value 經由 Bonferroni 法校正，ns 代表無顯著差異，*表示 p -value < 0.05。

從演化的角度來看，同義置換變異率 (K_S) 可以反映出中性演化下的核苷酸替換率，代表不同物種在演化壓力下相對穩定之數值。從不同譜系的 K_S 值分佈可以看到從演化初期的薔薇類植物到演化近期的含羞草屬有逐漸右偏的趨勢。不僅如此，含羞草屬特有基因 (Mimosa-specific) 有明顯的第二個波峰 ($K_S = 0.363$)，經確認有多達 27 個 novel core 基因 (18.75%) 的 K_S 值介於 0.3 到 0.5 之間。雖然 K_S 為一近乎中性之指數，但仍可能受到天擇強度之影響 (Zhang and Li, 2004)，此結果顯示此基因群有部分基因在演化過程中經歷低天擇壓力 (relax selection) 以致於新複製基因被容許擁有較多的同義置換變異。當這些利於物種生存之基因功能被保留下來，即新功能化 (neofunctionalization) (Ohno, 1970)，對應到含羞草屬特有基因較快的演化速度，造成 K_S 值較高 (圖四A)。

過去認為若異義置換率 (K_A) 和同義置換率 (K_S) 的比值 (K_A/K_S) 大於 1 代表正向天擇之訊號，然而此訊號在實際演化壓力下並不容易被觀察到。根據本研究結果 Rosid-core 的 K_A/K_S 值大部分分佈在 0.2 以下，表明這些基因可能受到嚴苛的淨化選汰 (purifying selection) 影響，而 Caesalpinioideae novel core 和 mimosoid novel core 的 K_A/K_S 分布同樣有右偏的現象。雖然 Mimosa-specific 的主峰值與其他譜系相似，但我們也發現高達 13% 的基因落在 0.55 至 1.0 之間，意味著這些基因積累了更多的異義置換 (圖四B)。

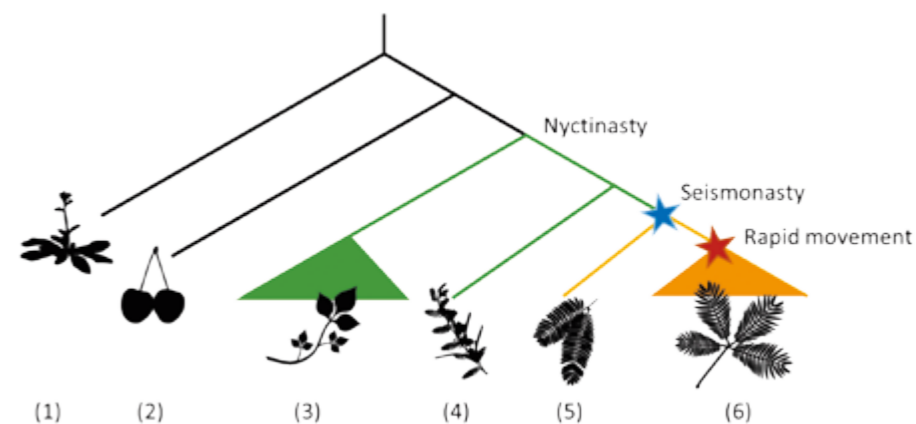
我們從 12,382 個葉枕表現基因中檢測到 701 個正向天擇基因 (positively selected genes, PSGs) 在 *M. pudica* 中 (圖四C)，其中以 Mimosa-specific 基因群的比例最高 (15.9%)。

由於我們選用五個含羞草物種共同的葉枕表現基因來做分析，我們推測部分與觸發運動相關的基因在含羞草屬分歧之後被保留下來，因此 Mimosa-specific 擁有較高的正向天擇基因。已知豆科植物的葉枕運動機制與氣孔開合機制相似，皆受滲透壓改變影響，在本研究鑑定出的 23 個 Mimosa-specific 正向天擇基因中，鈣離子通道 *CSC1* 受到顯著的正向天擇壓力 ($k = 11.01$) 影響，*AtCSC1* 過去曾被證實可受到短暫的滲透壓力改變而被活化，且已被證實與鈣、鉀、鈉離子透水性相關 (Hou et al., 2014)，顯示該基因影響含羞草葉枕快速運動之可能性。



圖四、Mimosa-specific 基因群之基因本體分析。分為分子功能 (molecular function, MF)、生物過程 (biological process, BP) 以及細胞組件 (cellular component, CC) 三大類。

總結以上結果，我們推測含羞草屬在演化初期經歷較低的淨化選汰壓力，發生基因革新事件使屬內物種獲得觸發運動能力，並在演化過程中增強部分演化支的正向天擇壓力，例如部分快速運動相關基因發生基因革新 (gene novelty)，可能與含羞草葉片獲得快速運動能力相關 (圖五)。



圖五、本研究之總結。藍色星號代表獲得觸發運動能力，紅色星號代表增強正向天擇壓力，獲得快速運動能力。(1) 阿拉伯芥屬 (*Arabidopsis*)，作為薔薇類 (Rosids) 代表；(2) 梅屬 (*Prunus*)，代表豆類 (fabids)；(3) 大豆屬 (*Glycine*)，代表蝶形花亞科；(4) 假含羞草屬 (*Chamaecrista*)，代表蘇木亞科；(5) 含羞草屬 (*Mimosa*)；(6) 敏感物種—含羞草 (*M. pudica*)，部分縮圖 (1-5) 引用自 PhyloPic 資料庫。



研究創新性與貢獻度

本研究為全球首次收集比較多個含羞草物種的葉枕轉錄體資料來探討含羞草屬的演化關係，並推導與快速運動相關之基因。相較於先前研究僅以單一葉綠體片段建立含羞草屬之親緣關係，我們利用多個物種的葉枕轉錄體確認其親緣關係，並結合其他物種之基因體進行比較多體學分析，建構出含羞草屬內的演化關係樹，並闡明其與快速運動的關係。不僅如此，本研究也重新確認含羞草屬內多個物種的葉枕運動能力，並針對葉枕運動能力進行分群。

因此，我們成功建立一種適用於非模式物種之比較多體學分析技術，以對含羞草屬的研究提供更全面的資訊。我們認為含羞草屬在不同的演化時間點受到不同的天擇壓力影響，讓該屬物種得以利用基因革新更有效率的進行葉片閉合以防禦植食性昆蟲，其中以鈣離子通道基因 *CSC1* 最可能參與含羞草快速運動機制。藉由研究含羞草葉枕的運動機制，透過篩選出可能影響其快速運動的基因，我們也期待未來將研究成果應用於其他同樣具有葉枕器官的豆科作物，可望改善氣候變遷下，豆科作物面臨逆境之對策。

陳怡如

就讀學校

國立台灣大學植物科學研究所

指導教授

陳賢明 助理教授



研究共同作者

謝文發 Boon Huat Cheah
林芝毓 Chih-Yu Lin
古語婷 Yu-Ting Ku
郭呈享 Cheng-Hsiang Kuo

張淵云 Yuan-Yun Zhang
陳炳榮 Bing-Rong Chen
陳賢明 Hieng-Ming Ting



野生綠豆對斜紋夜蛾抗性及其生物防治潛力

Induction of wild mungbean resistant to *Spodoptera litura* and its biocontrol potential

研究論文內容

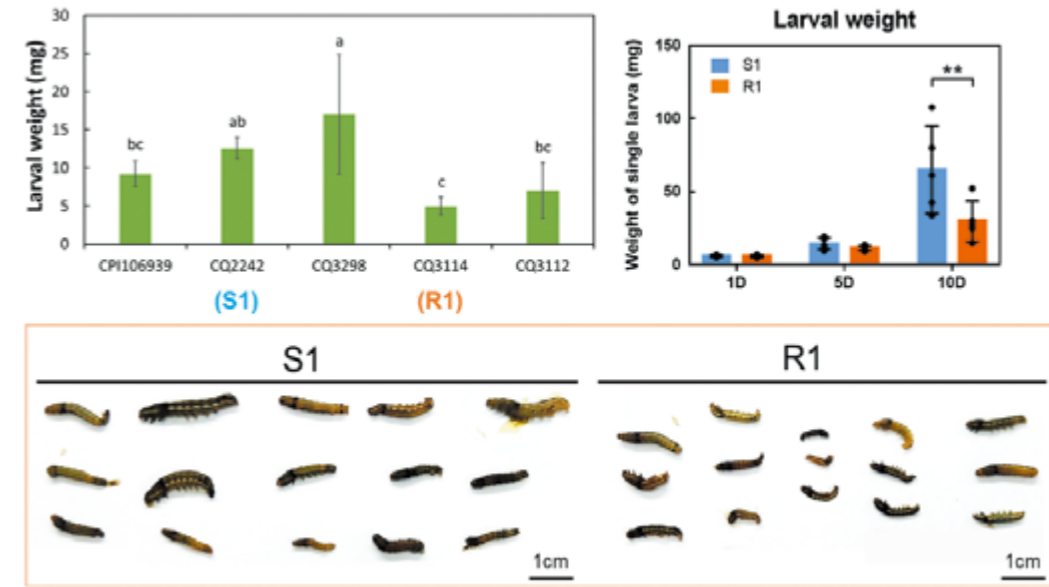
現今田間害蟲防治主要依賴化學藥劑的應用，這種方法效果迅速且明顯，但卻對環境生態造成潛在的威脅。因此，透過植物自身的防禦機制和天然代謝物來達到抗蟲的效果是對環境最友善的方法 (Bhati, 2020)。本研究的主要目的是探討野生綠豆品系對斜紋夜蛾的抗性及其防禦機制，並從中尋找潛在的抗蟲代謝物和抗性基因。

在本研究中，我們以五個野生綠豆品系的葉片餵食斜紋夜蛾幼蟲，進行對斜紋夜蛾幼蟲抗感試驗，篩選出具有抗性的 R1 品系 CQ3114 和 S1 品系 CQ2242 (圖一)。隨後，我們使用液相色譜質譜儀 (LC-MS) 和氣相色譜質譜儀 (GC-MS) 比較抗感品系中賀爾蒙和代謝物的累積含量。

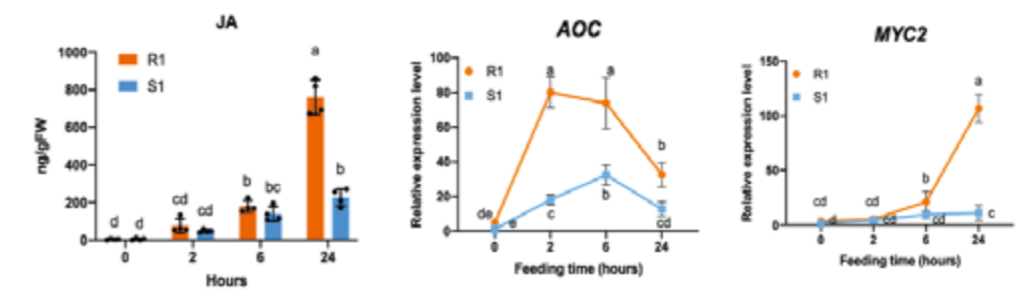
賀爾蒙累積含量的結果顯示：(1) 主要防禦賀爾蒙茉莉酸 (JA) 的累積含量在斜紋夜蛾幼蟲啃咬 24 小時後顯著增加。(2) 與 JA 生合成相關的基因丙二烯氧化環化酶 (AOC) 在斜紋夜蛾幼蟲啃咬 2 小時後表現量顯著上調。(3) JA 下游信號傳遞的轉錄因子 MYC2 在斜紋夜蛾幼蟲啃咬 24 小時後表現量顯著上調。這三個現象在兩個抗感品系中都觀察到，且 R1 品系的表現優於 S1 品系 (圖二)。

因此，我們推測賀爾蒙 JA 確實參與了野生綠豆對斜紋夜蛾幼蟲的防禦機制。代謝物累積含量的結果顯示：在斜紋夜蛾幼蟲啃咬後，R1 品系中誘導出許多未知代謝物及類黃酮代謝物，例如被報導具有抗蟲功效的Kaempferol 7-O-β-d-glucoside (圖三)。非揮發性代謝物主要累積在植物葉片中，對害蟲造成直接的防禦作用，而揮發性代謝物則被釋放到空氣中，主要吸引害蟲的天敵，屬於間接性防禦。在本次實驗中，我們也證實在斜紋夜蛾幼蟲啃咬後，R1 和 S1 釋放的氣體代謝物有所差異，其中 R1 釋放了 3-Hexenyl acetate 和 1-Octen-3-ol (圖四)。然而，3-Hexenyl acetate 已被報導為吸引害蟲天敵的重要訊號物質，同時也會促使鄰近植物的防禦反應上調 (Wei and Kang, 2011)。

綜上所述，我們發現在野生綠豆品系 CQ3114 中，在斜紋夜蛾幼蟲啃咬後，賀爾蒙 JA 會活化相關的防禦反應，促使下游代謝物類黃酮和揮發性氣體的產生，從而達到對抗害蟲的防禦反應。我們將繼續對目標代謝物進行抗蟲活性的測試。



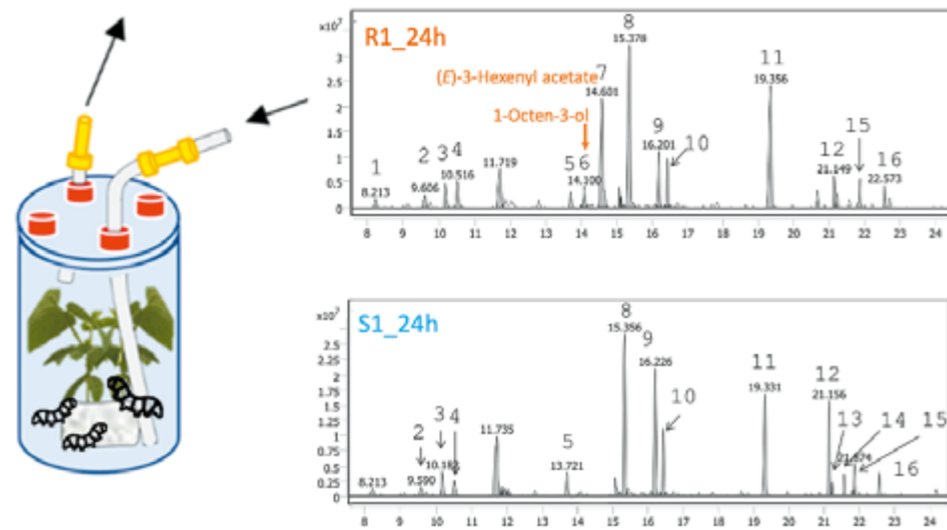
圖一、斜紋夜蛾幼蟲啃咬實驗。(A)分別餵食五個野生綠豆品系之斜紋夜蛾幼蟲重量；(B)分別餵食 R1 和 S1 葉片 1 天, 5 天及 10 天後之斜紋夜蛾幼蟲重量；(C)分別餵食 R1 和 S1 葉片 10 天後之斜紋夜蛾幼蟲型態。



圖二、斜紋夜蛾幼蟲啃咬後誘導之訊號因子和賀爾蒙生合成基因表現量與賀爾蒙含量。(A)茉莉酸累積含量；(B) JA 生合成基因(AOC)；(C)JA 訊號傳導轉錄因子(MYC2)。

Category	Compound	Mass	RT (min)	R6/R0	R24/R0	S6/S0	S24/S0
Phyttohormone	12-Oxo-phytyldienoic Acid	292.20	8.29				
Fatty acid	1-Linoleoyl-2-lysophosphatidic acid monomethyl ester	448.26	9.02				
	Arabidopside B	802.49	9.57				
	1-Hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (LPC 16:0/0:0)	495.33	8.86				
	1-(9Z,12Z-Octadecadienyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (LPC 18:2/0:0)	519.33	8.14				
Phospholipid	LysolPC(18:3(9Z,12Z,15Z)/0:0)	517.32	7.71				
	PC 2:0_16:3	531.30	5.50				
	PC 2:0_16:2	533.31	5.75				
Diterpenoid	(+)-pinoselinol-4-O-β-D-glucopyranoside	520.19	3.22				
Sesquiterpene	Germacrene	218.17	3.94				
Triterpenoid	Nandrolone	274.19	7.53				
	Oltoron	696.33	5.04				
Flavonoid	Dihydrochalcone	256.07	3.31				
	Kaempferol 3-β-D-glucoside	448.10	3.43				
	Kaempferol 7-O-β-D-glucoside	448.10	3.43				
	Maltol galactoside	288.08	1.90				
	Coumarin	146.04	3.02				
	2-(4-Hydroxyphenyl)-5,6,7,8-tetrahydroxy-4H-1-benzopyran-4-one	302.04	3.54				
	Quercetin 3-(2R-apsosyrutinoside)	742.20	3.38				
	Rutin	610.15	3.55				
Alkaloid	Adenosine	267.10	0.96				
	Indoleacrylic acid	187.06	2.79				
Unknown	Capsosulfesin C	512.30	6.31				
	C38 H58 N19 O4	844.49	10.04				
	C28 H59 N17 O12	801.45	7.10				
	C17 H40 N19 O3	558.35	7.22				
	C29 H63 N27 O5	869.54	9.45				
	C22 H53 N22 O5	705.46	9.85				
	C28 H64 N21 O13	902.50	9.81				
	C19 H48 N15 O8	614.38	5.77				

圖三、斜紋夜蛾幼蟲啃咬 6 小時及 24 小時後 R1 和 S1 的非揮發性代謝物含量。



圖四、斜紋夜蛾幼蟲啃咬 6 小時及 24 小時後 R1 和 S1 的揮發性代謝物差異。

研究創新性與貢獻度

由於全球暖化，為了減少人為二氧化碳的排放及響應「淨零碳排」ESG 目標，豆科蛋白為材料的植物肉日漸盛行，然而綠豆雖作為潛力作物之一，卻易受蟲害影響而大幅減產。至今，尚未有綠豆對抗草食性害蟲之相關研究，亦無相關代謝體研究，因此我們針對野生綠豆進行全面的基因比較分析及代謝體學分析，並希望透過分析後的結果，達成以下之目標：

- 1 鑑定出防禦相關基因及抗蟲化合物，更全面地瞭解綠豆的抗蟲防禦機制，並將其研發成為潛力生物農藥，減少病蟲害影響，從而提高作物產量與品質，作為作物有害生物綜合管理(IPM)策略之一。
- 2 透過分子標誌輔助及回交等育種手段，將防禦相關基因導入栽培種中，改良現有栽培種，可以降低栽培的成本，亦能增加單位面積產量，並可達到永續發展目標 (Sustainable Development Goals, SDGs) 的第 2, 12, 13 項目標，因應氣候變遷、解決糧食問題及促進綠色經濟。
- 3 鑑定出許多未知的代謝物，其多樣性有助於植物代謝體學發展及新型農藥的開發。



應用創新組 獎項



蔡欣亞

就讀學校

國立臺灣大學農業化學系 博士班

指導教授

蘇南維 教授

研究共同作者

蔡欣亞	Hsin-Ya Tsai
許 宸	Chen Hsu
陳名妤	Ming-Yu Chen
陳聖東	Sheng-Dong Chen
蘇南維	Nan-Wei Su



建立結合ATP再生之耦合酵素系統生產類黃酮磷酸酯

Synthesis of flavonoid phosphate derivatives via a coupled biocatalytic system involving ATP regeneration

研究論文內容

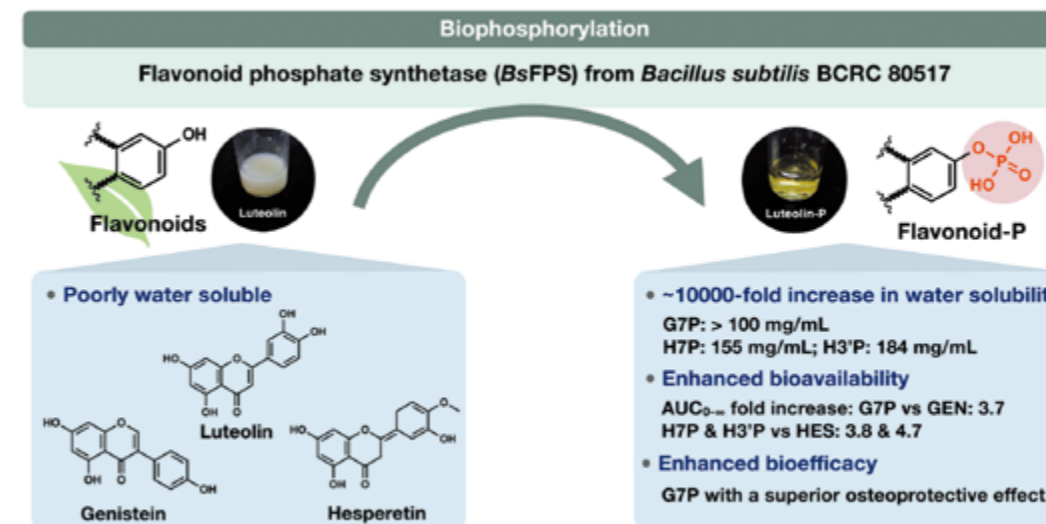
隨著高齡化社會及後疫情時代的來臨，民眾對於保健營養食品的需求漸增，2022年全球保健營養食品市場規模已高達8,697億美元（Euromonitor統計資料）。廣泛存在於植物中的類黃酮成分具有多樣的生理活性，應用於各類保健營養食品中，也是許多農業副產物中主要的活性成分。

如何創造農業副產物的附加價值並提升農業資源的利用率，是現今國際農業發展的趨勢。目前類黃酮在農業副產物價值化的應用大多係自農業副產物中製備富含植物營養素的萃取物，以作為植物膳食補充劑或機能性食品原料。然而，根據生物藥劑學分類系統，水溶性是影響藥物及營養素口服吸收的關鍵，但多數類黃酮的水溶性差，普遍生物可利用率（bioavailability）低，導致許多活性成分難以在體內發揮應有功效。因此，若能有效提升類黃酮的水溶性及生物可利用率，將對植物營養素的應用以及廣大的植物膳食補充劑產業帶來突破性的發展，並帶動農業副產物的加值循環再利用。

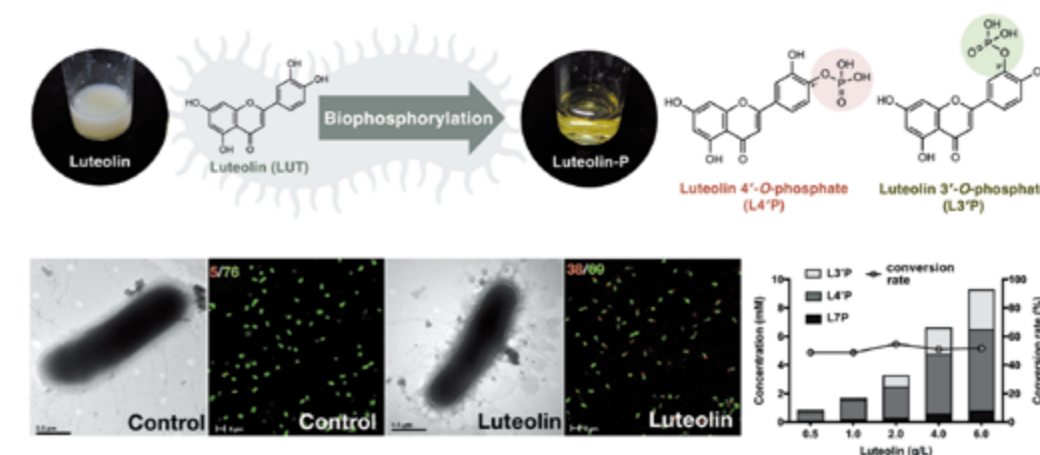
本研究室先前由納豆中篩選出*Bacillus subtilis* BCRC 80517菌株，發現其具有一種新穎的類黃酮磷酸化代謝模式，可透過體內的類黃酮磷酸酯合成酶（flavonoid phosphate synthetase, *BsFPS*）來催化類黃酮的磷酸化，釋出高水溶性的類黃酮磷酸酯產物。不僅其水溶性可大幅提升，並可有效改善類黃酮的生物可利用率及生物活性（圖一），未來將可運用此新穎的生物磷酸化技術於生產口服吸收狀況較良好的類黃酮磷酸酯。然而，我們發現枯草桿菌對許多類黃酮的磷酸化效率不盡理想，關鍵問題在於類黃酮亦為植物防禦素（phytoalexins），我們發現許多的類黃酮基質會對微生物造成毒性。以木犀草素為例，其會造成細菌細胞膜破損並連帶影響磷酸酯化能力，導致整體轉換率不佳（圖二）。因此，建立*in vitro*酵素合成系統有其必要性。

再者，目前已知類黃酮磷酸酯合成酶可催化多達十餘種不同結構之類黃酮，具備將多種類黃酮進行磷酸化的優勢。本研究以木犀草素（luteolin）為標的，建構類黃酮磷酸酯的酵素合成平台，解決微生物轉化系統的限制，以將磷酸酯修飾技術應用於更多不同種類的類黃酮，拓展生物磷酸化技術的應用範圍。

然而，目前酵素轉換模式在應用上仍有生產成本過高的劣勢，係因類黃酮磷酸酯合成酶（*BsFPS*）只能仰賴成本高昂的ATP作為磷酸酯化反應的共同基質，不利於發展為大規模生產的酵素製程。



圖一、類黃酮之生物磷酸化。



圖二、木犀草素對枯草桿菌外觀型態及磷酸化轉化效率之影響。

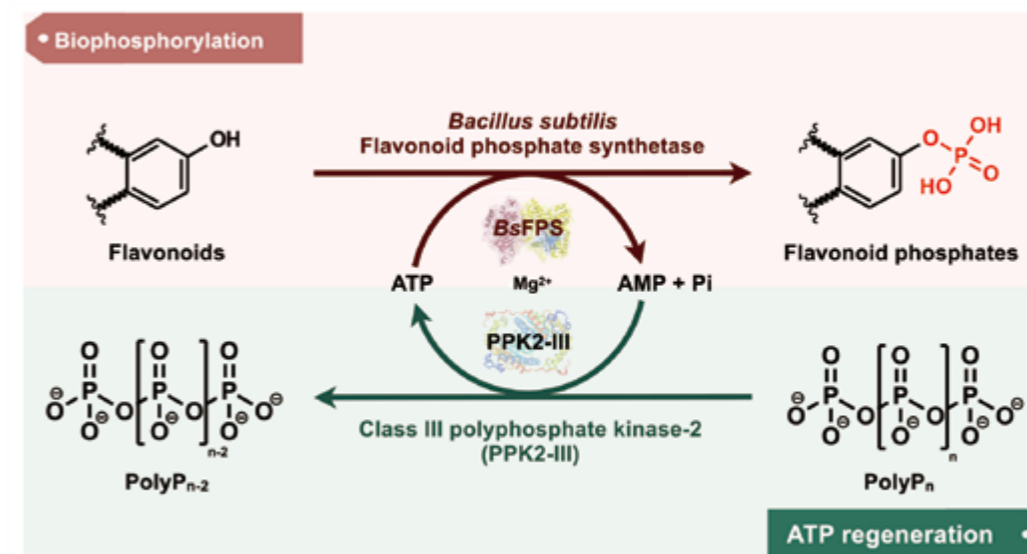


本研究引進ATP再生的概念，使用第三型聚磷酸鹽激酶2 (class III polyphosphate kinase 2, PPK2-III) 來協助ATP再生，其特點在於可利用成本低廉的聚磷酸鹽作為磷酸根來源，將*BsFPS*反應釋出的AMP轉換回ATP，透過循環利用ATP減少ATP用量，建構具ATP再生能力的耦合酵素系統以生產類黃酮磷酸酯 (圖三)。為找到合適的ATP再生酵素，首先篩選不同來源的PPK2-III酵素並建立重組蛋白表現系統，期望找到於*BsFPS*最佳反應條件下 (40°C 及 pH7.8) 活性良好的酵素，以建立一鍋式 (one pot) 反應系統。

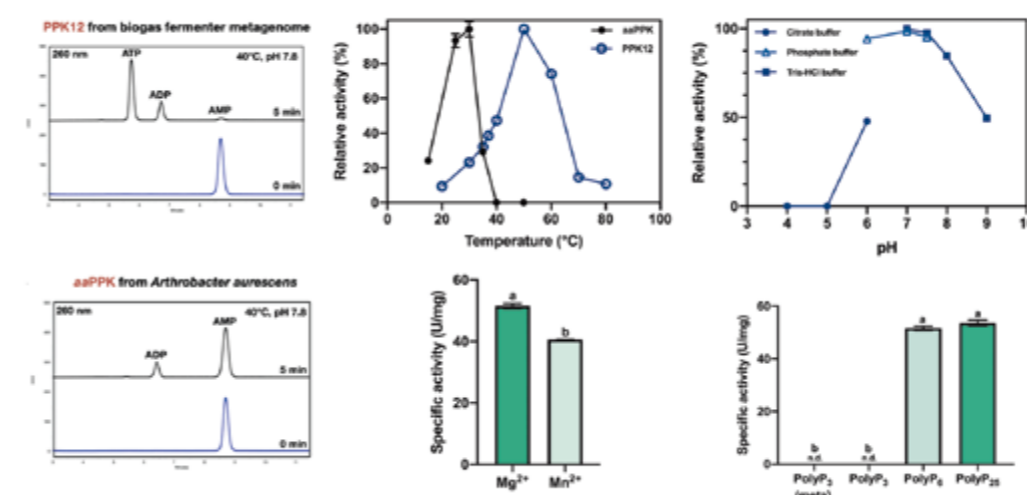
我們發現PPK12在40°C具有較高的ATP生成活性，aaPPK在同溫度下則幾乎難以生成ATP。PPK12的生化特性分析結果顯示，其在50°C、pH7.0條件下具有最高活性，且與*BsFPS*相似兩者皆偏好使用Mg²⁺作為輔因子，並偏好使用六偏磷酸鹽及多聚磷酸鹽 (圖四)。此外，在40°C及pH7.8條件下，PPK12的比活性遠高於*BsFPS*，表示兩酵素相容性良好且系統中ATP再生快速，可持續供應ATP以供*BsFPS*進行類黃酮磷酸化。最終我們選擇PPK12與*BsFPS*組成耦合酵素系統，以Mg²⁺作為兩酵素催化所需之二價陽離子，並以價格低廉且組成單純之六偏磷酸鹽作為AMP磷酸化所需基質。

由於一鍋式的反應系統組成較為複雜，系統中包含兩酵素的基質、產物及助溶劑DMSO，因此，我們在反應系統中加入木犀草素及AMP，以評估PPK12在耦合酵素系統中是否仍具ATP再生能力。在系統起初缺乏ATP的條件下，單憑*BsFPS*並無法催化磷酸酯產物的生成，但加入PPK12後，耦合酵素系統即可將大部分的木犀草素轉換為磷酸酯產物，顯示在反應系統中PPK12確實能將AMP再生回ATP，以供*BsFPS*進行類黃酮磷酸化。在優化反應條件後，目前可減少近九成的ATP用量，並達到近八成的轉換率 (圖五)。

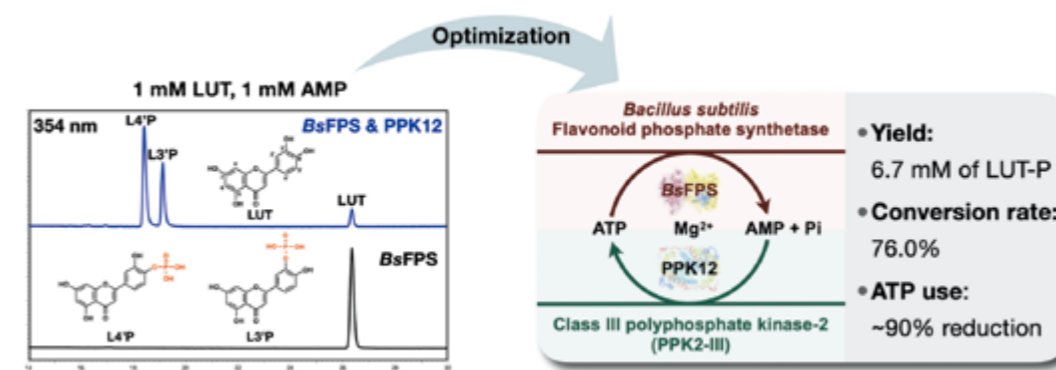
本研究首次建立結合ATP再生的類黃酮磷酸酯酵素合成系統，將有助於未來發展工業化酵素製程以生產具高水溶好吸收特性的新穎類黃酮磷酸酯衍生物，為類黃酮等多酚類植物營養素長期以來因難溶於水而功效不彰的應用困境提供解方，並開啟農業副產物高值化應用的新篇章。



圖三、結合ATP再生之耦合酵素系統生產類黃酮磷酸酯之示意圖。



圖四、ATP再生酵素PPK12之生化特性。



圖五、利用耦合酵素系統轉換生成木犀草素磷酸酯。



研究創新性與貢獻度

新穎的類黃酮磷酸酯具有發展作為新一代高水溶好吸收植物膳食補充劑的應用潛力，但迄今類黃酮的磷酸酯化修飾只能仰賴化學合成，本研究首次建立類黃酮的酵素磷酸化修飾平台，提供類黃酮磷酸酯一個更為永續的生產方案。

此外，透過結合ATP再生目前已減少近九成的ATP用量，大幅提升酵素製程的經濟效益。研究成果符合現今綠色/永續化學的趨勢，且為未來發展具成本效益的類黃酮磷酸酯酵素合成平台奠定基石，將有助於未來產業化應用的實行。本研究建立的類黃酮磷酸酯酵素合成系統，可改善目前許多類黃酮等植物營養素相關保健品吸收不理想的應用困境，我們也正持續探索酵素磷酸化適用的植物營養素種類，期望能進一步拓展其適用範圍，透過生物磷酸化技術提升更多農業副產物的附加價值，並推動其循環利用，為農業副產物的加值化注入新動力。

應用創新組 銀獎

蔡健浩

就讀學校

國立中興大學
循環經濟學院 植保博士學程

指導教授

黃振文 特聘教授
洪爭坊 助理教授



研究共同作者

蔡健浩	Chai Chien Hao
洪爭坊	Cheng-Fang Hong
黃振文	Jenn-Wen Huang



多功能生物防治菌 *Streptomyces griseorubiginosus* LJS06 的鑑定與其防治胡瓜炭疽病的機制

Identification and characterization of a multifunctional biocontrol agent, *Streptomyces griseorubiginosus* LJS06, against cucumber anthracnose

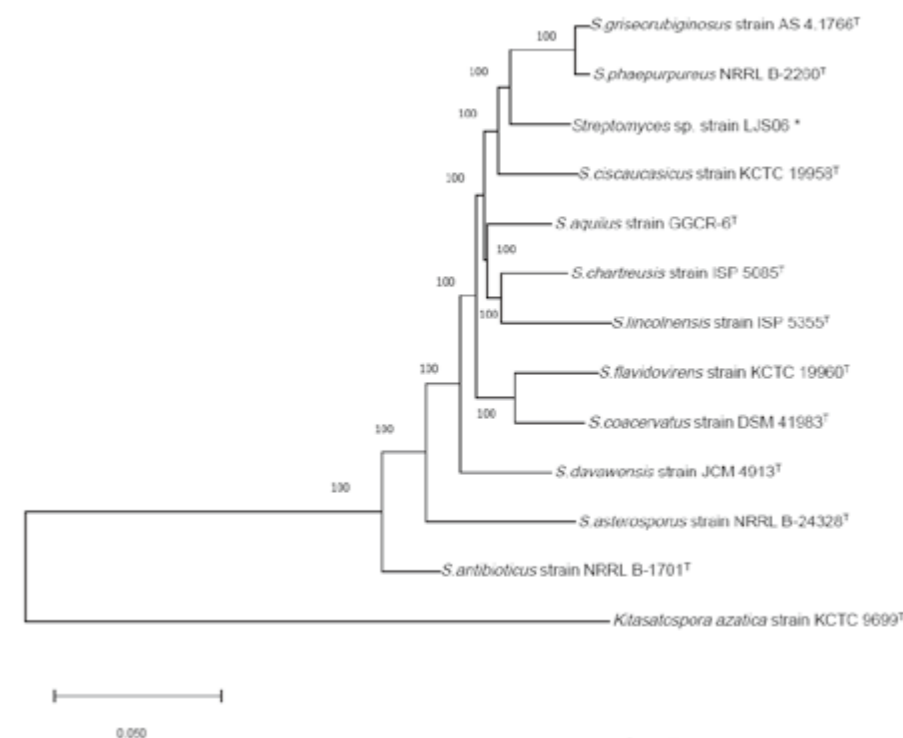
研究論文內容

胡瓜係連續採收的蔬菜作物，常用於沙拉或鮮食產品，植株於採收期間若遭病原為害時，農友為了避免病害影響果實品質與產量，不得不施用化學藥劑進行防治，但可能因此而忽略了安全採收期的限制，導致農藥殘留超過安全容許量的問題。為了解決連續採收作物的病害問題，同時顧及食品安全與農業環境永續經營的目標，本研究的主要目的在於（1）篩選與鑑定具有防治胡瓜炭疽病的拮抗微生物菌株；（2）評估拮抗微生物營養需求和培養條件，並研發微生物製劑的雛型配方；（3）探討微生物製劑防治胡瓜炭疽病的原理，進而開發具有多元施用方式與多重效果的植物保健製劑產品，以造福農友與消費者，並減少農藥對環境的影響，創造三贏的局面。

本試驗所採用的鏈黴菌LJS06菌株，係由臺中市龍井地區採集之土壤中分離獲得。鏈黴菌LJS06對胡瓜炭疽病菌（*Colletotrichum orbiculare*）具有優異的抑制效果，且能有效防治胡瓜炭疽病的發生。在胡瓜幼苗澆灌鏈黴菌LJS06孢子懸浮液後，除了發現胡瓜幼苗的株高與根長均明顯增加外，炭疽病的病勢進展也受到控制，證明鏈黴菌LJS06除能促進胡瓜植株生長外，亦可誘導胡瓜植株啟動抗病反應。

本研究初期利用形態與16SrRNA的序列，初步鑑定鏈黴菌LJS06為 *Streptomyces* 屬之菌種。進一步採用生理生化測試與數個管家基因進行多位點基因序列分析（MLSA），並依照所建立的親緣關係樹，分析發現LJS06菌株與 *Streptomyces griseorubiginosus* strain AS 4.1766^T 菌株的親緣最為相近（圖一）。進一步分析LJS06利用碳素源的結果，發現該菌株除了無法以纖維素作為碳源外，其餘皆與 *Streptomyces griseorubiginosus* strain AS 4.1766^T 的生理生化特性吻合。綜合鏈黴菌LJS06的形態、多位點基因序列分析，以及生理生化特性等結果，將LJS06菌株鑑定為 *Streptomyces griseorubiginosus* (Ryabova and Preobrazhenskaya) Pridham et al.。而在過去的文獻中，*Streptomyces griseorubiginosus* 並沒有造成植物病害的紀錄，且對於該種鏈黴菌的相關研究，大多集中於探討其所產生的抗真菌或抗細菌物質，顯示鏈黴菌LJS06具有進一步開發成為生物防治菌的潛力。

鏈黴菌常被用作防治植物病害，主要歸功於其可產生多種水解酵素，若欲將鏈黴菌發展成生物防治製劑或生物性肥料，菌株之選擇與使用成效取決於菌株本身生理特性，特別是在產生水解酵素能力上的差異。本研究發現鏈黴菌LJS06菌株可產生多胺類物質和多種水解酵素，並可將tryptophan轉化為IAA及加速鐵螯合物質的形成，是一株值得開發成為生物農藥或生物肥料的菌種。將鏈黴菌LJS06進行發酵培養後，發現其具有產生不同種類的二次代謝物質的能力，並可以促進胡瓜植物生育及誘導植株抗病。本研究發現將其培養5天後，稀釋100倍之SL06發酵液，可以顯著抑制炭疽病菌的孢子發芽率和其附著器的形成比率。進一步將SL06發酵液施用在植株時，發現噴灑於葉片或根部澆灌兩種不同處理方式，均能有效抑制炭疽病的發生，證明其除了能直接抑制病原菌生長，亦能誘導植物產生抗病能力，進而表現防病功效。

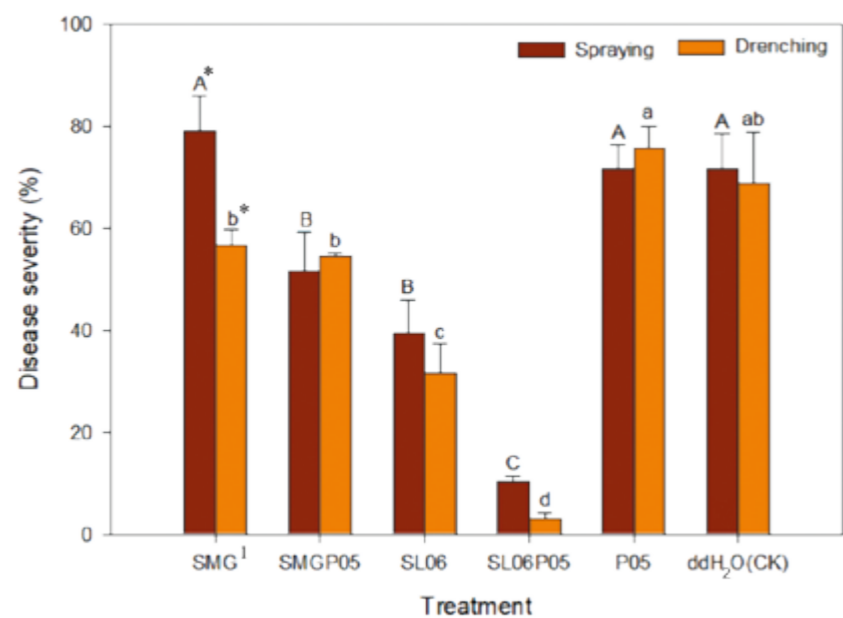


圖一、利用多位點基因序列分析建構之鏈黴菌LJS06親緣關係樹。

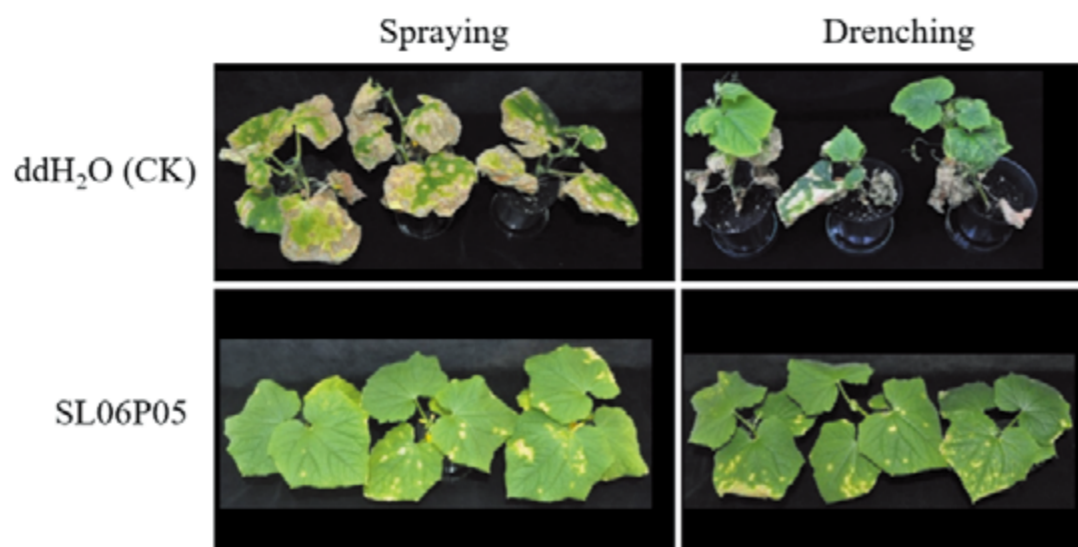
本研究中，以 K_2HPO_4 作為發酵液之發酵終止劑，以防止發酵液持續發酵，致使有效成分變質。 K_2HPO_4 是公認安全之鹽類，施用在作物時，亦可作為磷和鉀元素的來源。在過去研究亦指出 K_2HPO_4 可抑制病原菌之生長，惟因 K_2HPO_4 為鹼性鹽類，高濃度時有會破壞葉部表面的蠟質，致使病原菌易於侵入和遭受害蟲啃食，故本研究僅添加 0.5% (w/v) K_2HPO_4 作為終止發酵的濃度。本試驗發現添加 0.5% (w/v) K_2HPO_4 之 SL06P05 發酵液較 SL06 發酵液更具顯著抑制炭疽病原菌的孢子發芽率和附著器形成率的效果。將 SL06P05 發酵液以葉部噴灑與根部澆灌兩種方式處理，更能夠顯著抑制炭疽病的發生（圖二），在進一步的溫室試驗中，亦發現 SL06P05 的防病功效優於 SL06 發酵液（圖三）。

本研究除了利用鏈黴菌LJS06菌株的二次代謝物，透過影響病原菌的能量代謝途徑（圖四），進而抑制植物病原菌發芽與感染植株外，開發的SL06P05處方又可直接以根部灌注施用，誘導植物啟動抗病反應相關基因（圖五），增加了該技術的多元應用價值。

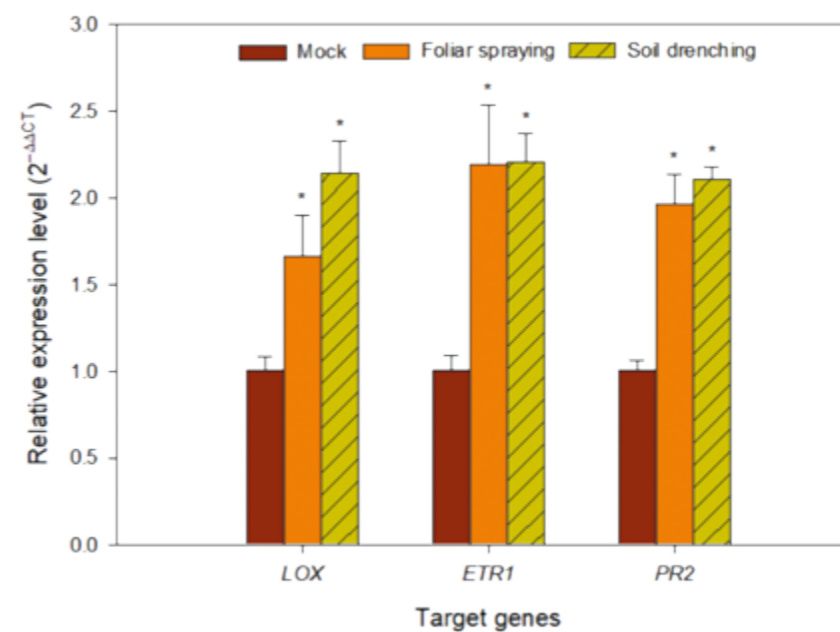
展望未來，筆者認為LJS06的研發方向，可依其不同的作用機制模式，研發不同劑型的植物保護製劑。此外，為配合國家推動淨零碳排工作，製劑配方的成分亦可以導入農業副產物如：椰纖，菇類栽培廢棄基質、或使用過的泥炭土中，以研製抑病栽培介質或抑病堆肥...等產品，達到農業永續循環與減碳增匯的效益。



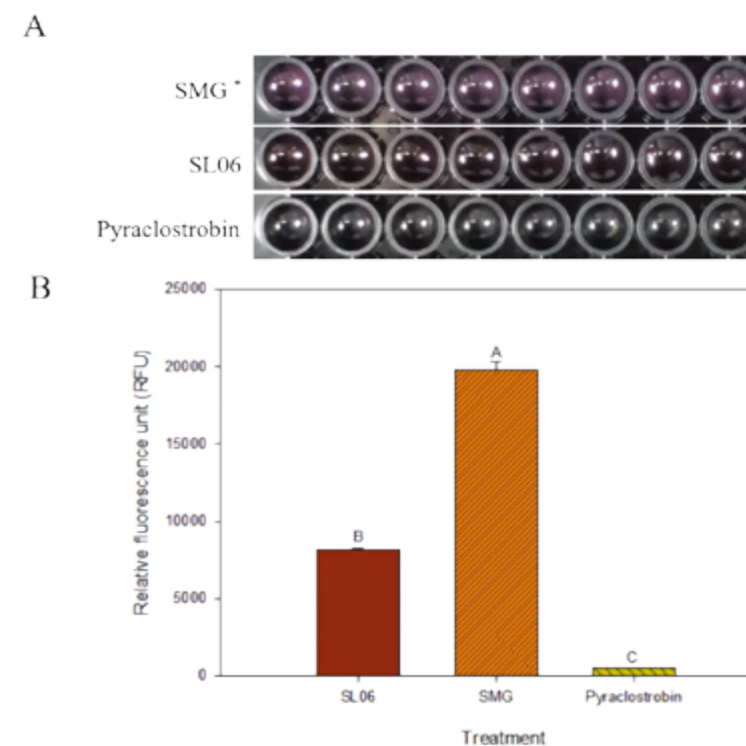
圖二、利用 *Streptomyces griseorubiginosus* LJS06 調製的 SL06 與 SL06P05 製劑對於胡瓜炭疽病之防治效果顯著優於其他對照組。



圖三、噴佈或澆灌 SL06P05 製劑之 100 倍稀釋液防治胡瓜炭疽病的效果顯著優於對照組。



圖四、*Streptomyces griseorubiginosus* LJS06 調製的 SL06 製劑 100 倍稀釋液對胡瓜炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare* COC3) 能量代謝之影響。(A) 經過 24 小時後，SL06 稀釋液、SMG 與 pyraclostrobin 之呈色反應差異；(B) 處理後之相對螢光數值較低，表示病原菌的能量代謝途徑受到抑制。



圖五、噴佈或澆灌 SL06P05 製劑之胡瓜植株接種 *Colletotrichum orbiculare* COC3 後，可提升其抗病標的基因 LOX (Lipoxygenase)、ETR1 (Ethylene Receptor 1) 及 PR2 (Pathogenesis-related protein 2) 之相對表現量。



研究創新性與貢獻度

1 創新性

在生物防治的應用上，大多將微生物直接施用於防治部位，使其直接保護作物，或是僅使用具有促進植物生長效果的微生物，鮮少有除了直接抑制病原菌生長，同時又能在土壤施用拮抗微生物或是其培養濾液後，仍可誘導植體啟動抗病反應的報導。本研究首次證實台灣本土的鏈黴菌LJS06菌株，其SL06P05製劑配方除了可直接噴施於葉片抑制炭疽菌的感染外，亦可藉由根部灌注，促進植株的發育並啟動胡瓜抗病基因，以抵抗炭疽病菌為害。為了確保胡瓜連續採收的安全性，若在胡瓜不同的生長時期，綜合採行適宜的方式施用SL06P05配方防治胡瓜炭疽病，除能減少農藥殘留帶來的食品安全疑慮，也同時兼顧果實品質與產量，確實為病害管理的創新技術。

2 貢獻度

現行的植物病害防治仍以化學農藥為主，為避免過度依賴農藥，研發其他替代性植保製劑以取代化學防治為當務之急。本研究開發的鏈黴菌LJS06菌株，可調製成不同劑型的微生物植物保護製劑與抑病栽培介質，應用於保護胡瓜植株的健康時，可取代連續採收期的化學農藥，提高瓜果的品質與安全性。此外，SL06P05製劑配方，可結合農業副產物，例如：椰纖、廢棄菇類栽培基質、果菜渣...等研製成抑病栽培介質或堆肥，深具多元應用價值與農業永續循環及減碳增匯的效益。

應用創新組 銅獎

黃彥翔 陳令瑜

就讀學校

國立中興大學 農藝學系

指導教授

高崇峰 副教授

研究共同作者

黃彥翔 Yen-Hsiang Huang
 古新梅 Hsin-Mei Ku
 王崇安 Chong-An Wang
 陳令瑜 Ling-Yu Chen
 何善學 Shan-Syue He



陳述 Shu Chen
 廖柏竣 Po-Chun Liao
 阮品淵 Pin-Yuan Juan
 高崇峰 Chung-Feng Kao



利用多重插補法分析臺灣毛豆種原遺傳歧異度與核心收集之建立

A multiple phenotype imputation method for genetic diversity and core collection in Taiwanese vegetable soybean

研究論文內容

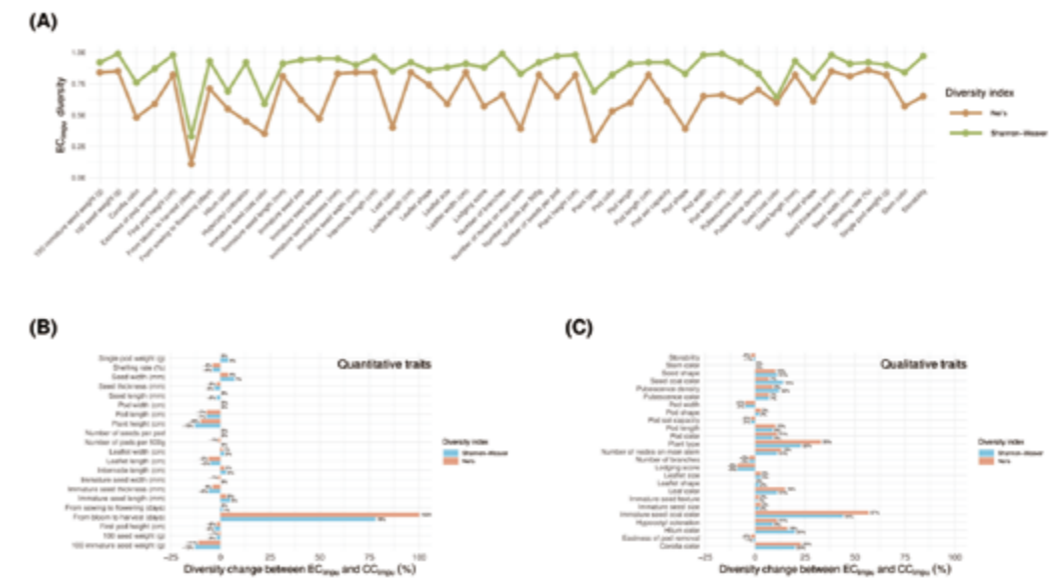
種原收集系 (germplasm accessions) 的蒐集與保存，是確保作物多樣性與遺傳資源可有效利用與改良的重要關鍵。核心收集 (core collection, CC) 能夠有效保留種原遺傳歧異度與重要特性，是最具完整種原 (entire collection, EC) 代表性的最小集合，有助於降低種原維護與管理成本，提高種原利用效率。然而，種原常有表型性狀缺失值問題，導致種原間遺傳距離 (即相似度) 計算產生偏誤，影響核心收集的代表性。

在本研究中，我們導入缺失值多重插補 (multiple imputation) 演算法，透過 bootstrap 重複取樣、統計建模及迭代演算，在不改變毛豆表型性狀資料原有結構及資料間的共變關係下，考慮統計分析過程中可能產生的不確定性，重複估計表型缺失值原本可能的面貌與共變結構。種原性狀的完整性讓我們能夠一窺種原間複雜的族群結構，探勘親緣關係。這有助於毛豆優良性狀、最具潛力及代表性之核心收集系的選拔。

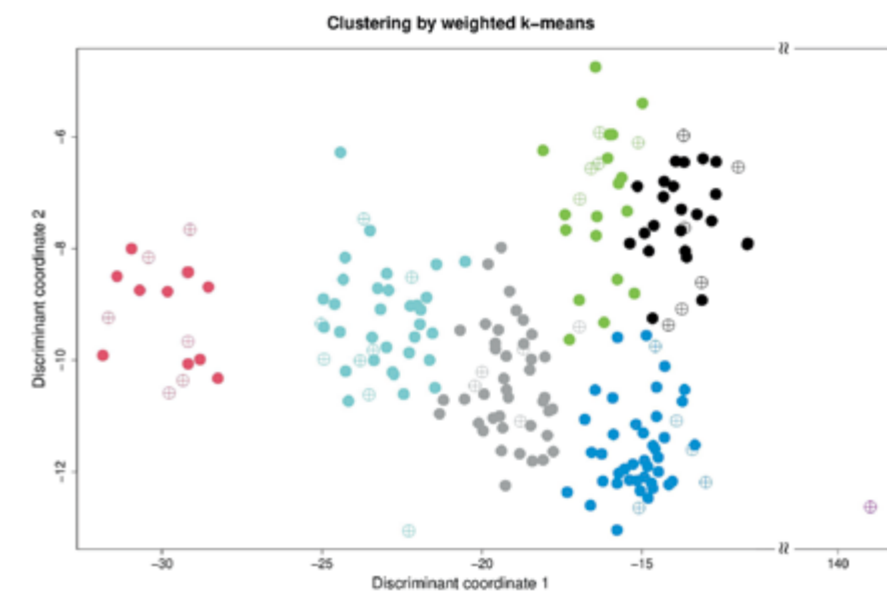
我們分析臺灣200個毛豆種原46個表型性狀資料，利用PowerCore軟體進行種原核心收集系選拔。實證結果顯示，相較於未處理表型缺失值的 EC_{raw} (43個核心收集系， CC_{raw})，經多重插補法處理的 EC_{impu} ，僅需36個核心收集系 (CC_{impu}) 能夠最大程度保留種原遺傳歧異度 (保留了超過61%性狀歧異度)，同時兼顧種原的豐富度及均勻性 (圖一)，具備完整種原代表性。特別地，這36個 CC_{impu} 均勻地分布在200個毛豆種原的7個群集中 (圖二)。此外， CC_{impu} 在所有46項性狀上都呈現出與 EC_{impu} 一致的集中趨勢、散佈情況與分布頻度 (圖三、四)，代表我們建立的 CC_{impu} 能夠代表原始種原的遺傳多樣性。

值得注意的是，與 EC_{impu} 收集系間的遺傳距離相比， EC_{raw} 明顯被低估，影響種原間相似度的評估，導致需要選拔更多的核心收集系來填補遺失的特性。再者，一些具有獨特性 (耐熱葉披針型) 的收集系 (如KG0001與KG0054)，即使存在高性狀缺失率，我們仍然能夠準確地從種原庫中挑選出來 (如 CC_{impu}) (圖五)。

本研究實證結果表明，表型缺失值確實會掩蓋種原的獨特性狀，使遺傳距離被低估，從而導致核心收集的選拔產生偏誤。研究證實，經多重插補法處理後的種原資料所建立的核心收集，能有效且精確地精簡種原庫、保留遺傳變異、活化種原利用與育種效率，提升臺灣毛豆在國際的競爭力。

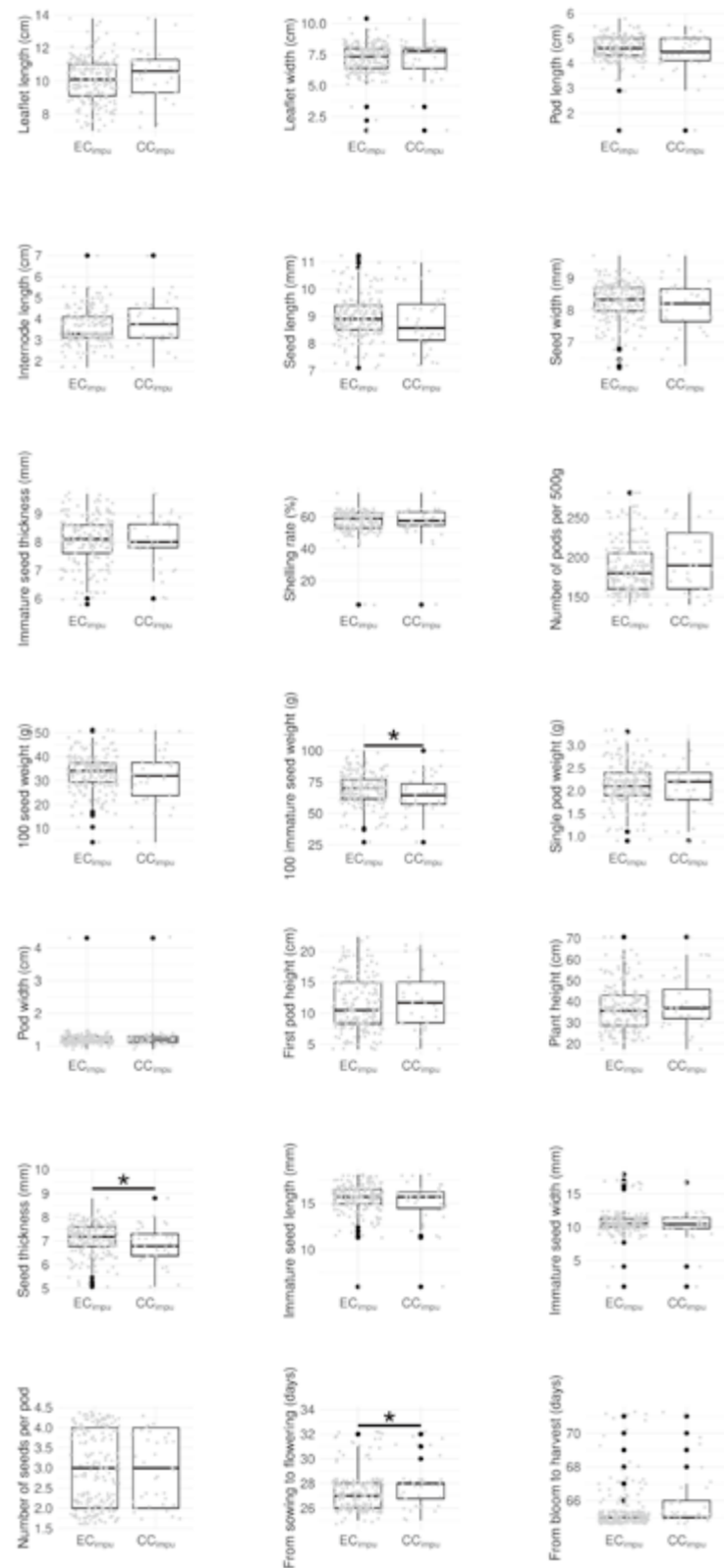


圖一、臺灣毛豆種原之性狀遺傳歧異度。(A) 200個毛豆種原 (EC_{impu}) 中每項表型性狀的歧異度指數。(B) 數量性狀中 EC_{impu} 和 CC_{impu} 的歧異度比較。(C) 類別性狀中 EC_{impu} 和 CC_{impu} 的歧異度比較。當歧異度指數之差大於等於0%時，代表性狀歧異度被保留 (retained)，小於0%則代表喪失歧異度 (lost)。

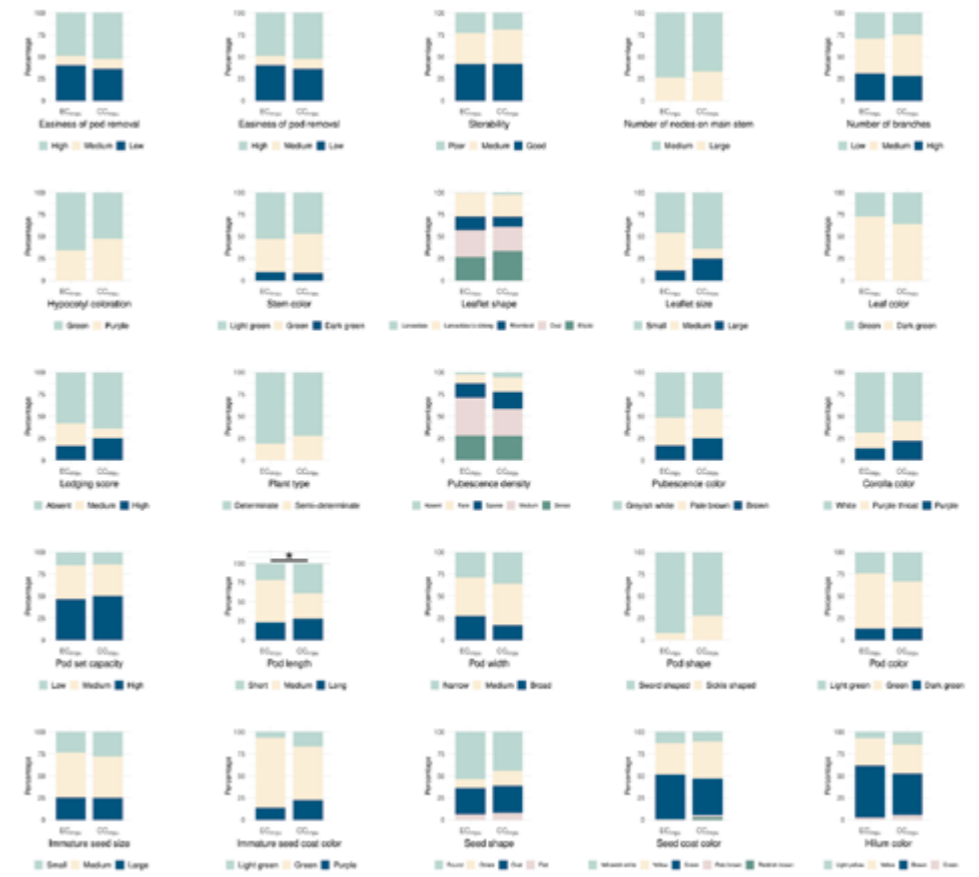


圖二、經多重插補法處理的46項表型性狀與200個臺灣毛豆種原 (EC_{impu}) 進行加權 k -means 分群分析。200個毛豆種原依性狀特性可區分為七個群集，其中⊕代表本研究選出的36個核心收集系。

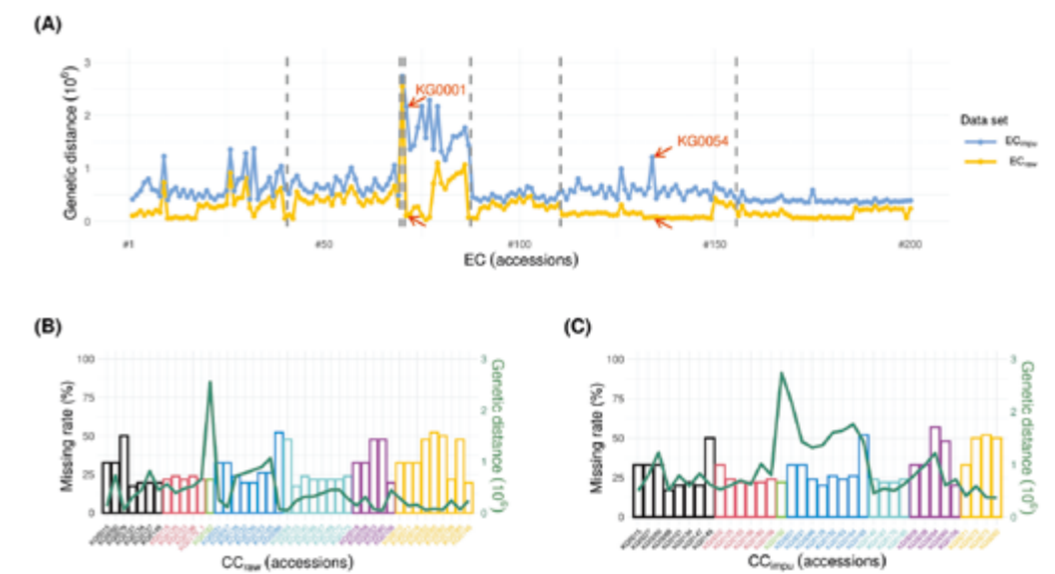




圖三、完整種原 (EC_{impv}) 與核心收集 (CC_{impv}) 之21項數量性狀的盒鬚圖。每個灰點代表一個種原，星號代表該性狀在EC_{impv}與CC_{impv}間的分佈達統計上顯著差異 ($p < 0.05$)。



圖四、完整種原 (EC_{impv}) 與核心收集 (CC_{impv}) 之25項類別性狀的長條圖。顏色代表性狀中不同的等級，星號代表該性狀在EC_{impv}與CC_{impv}間的分佈達統計上顯著差異 ($p < 0.05$)。



圖五、性狀缺失值對遺傳距離評估的影響。(A) 200個種原在七個群集中 (虛線分隔) 的遺傳距離分布。藍、黃色折線分別代表經缺失值處理的種原資料 (EC_{impv}) 與原始種原資料 (EC_{raw}) 所計算的遺傳距離。(B) 使用原始種原資料建立的核心收集 (CC_{raw})，43個種原在各群集的分布、性狀缺失率和遺傳距離。(C) 使用經缺失值處理的種原資料建立的核心收集 (CC_{impv})，36個種原在各群集的分布、性狀缺失率和遺傳距離。

研究創新性與貢獻度

1 創新性

在種原核心收集選拔時，導入多重插補演算技術，研究證實毛豆種原表型缺失值，會低估種原間遺傳距離（即種原間的相似度），甚至錯誤的選拔核心收集系，造成種原無法做有效利用。

2 貢獻度

1. 導入多重插補演算技術，克服毛豆種原表型缺失值困境，建立臺灣毛豆種原表型資料庫的完整性，能夠真實呈現種原間的結構與遺傳變異，為毛豆品種改良與後續研究參考之重要資料庫。

2. 實證結果顯示，表型缺失值經多重插補演算處理，考量資料演算過程中可能產生的不確定性，有較低的偏誤與較高的確準度，能夠較準確地估計種原間遺傳距離、保留獨特變異性、有效精簡種原，精準選拔臺灣毛豆核心收集系，達到種原有效之利用。

3. 利用缺失值插補建立種原庫的完整性，能夠有效探索種原族群結構、親緣關係及複雜的種原資源，強化種原利用，提升育種效率。

4. 多重插補法能提供穩健的插補值，適用於具相關性的表型資料產生之缺失值，推估結果亦優於其它缺失值處理方法。

5. 未來能夠針對核心收集系之基因型資料進行族群結構與親緣分析，篩選出具商業應用價值之毛豆種原或族群，達到種原活化之目標。

王鼎慈

就讀學校

國立臺灣大學
生物機電工程學系碩士班

指導教授

陳世芳 副教授

研究共同作者

王 鼎 慈	Ding-Ci Wang
陳 世 芳	Shih-Fang Chen
林 秀 樂	Xiu-Rui Lin
蔡 憲 宗	Xian-Zong Tsai



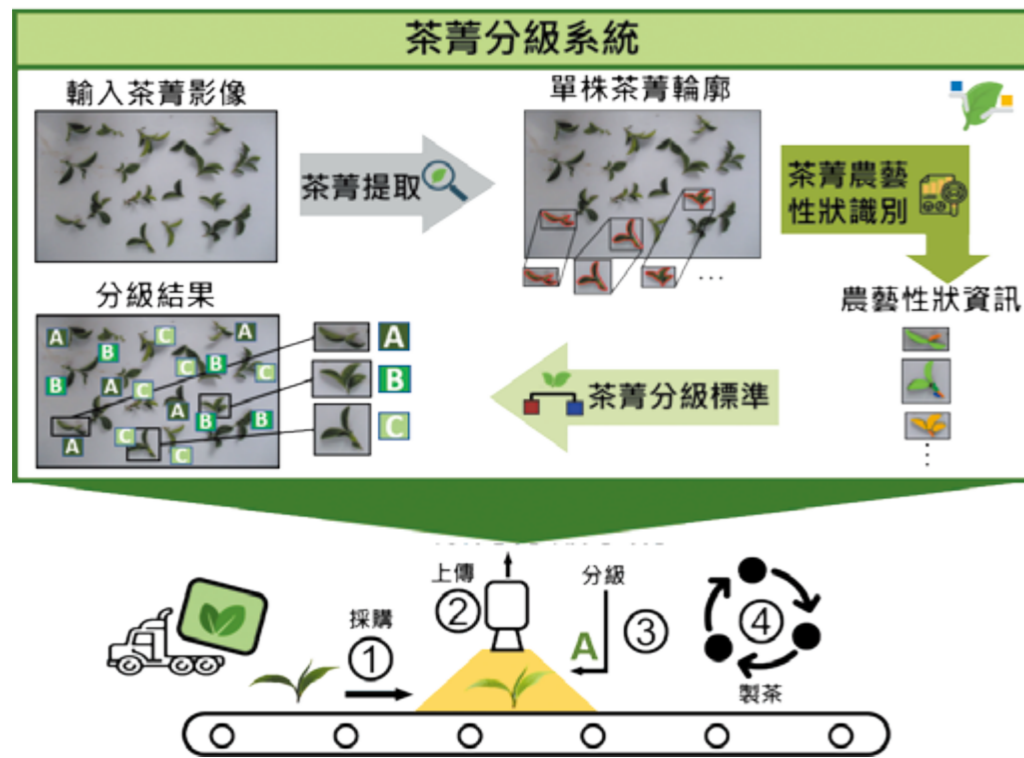
應用深度學習方法於茶菁影像識別及其分級系統之開發

Application of deep learning methods to develop fresh tea shoots image identification and grading system

研究論文內容

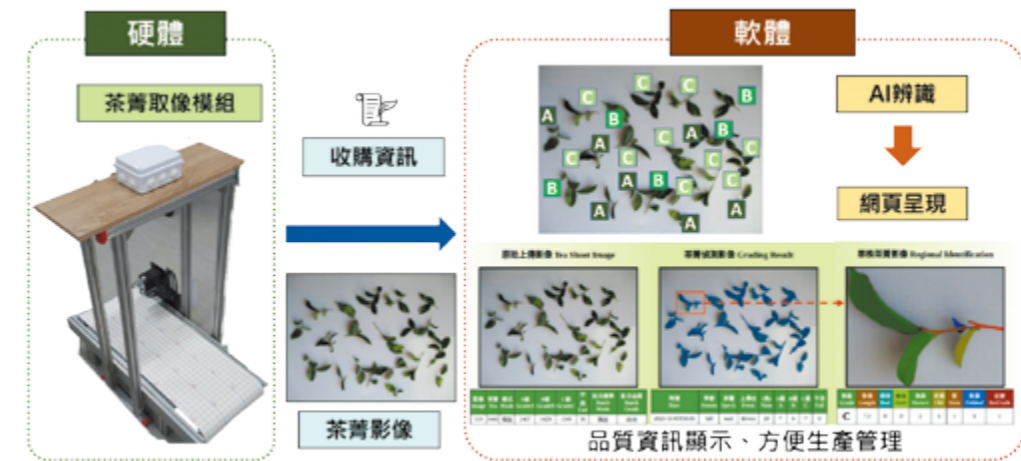
臺灣茶世界香，茶業持續在臺灣創造可觀的經濟效益。綜觀製茶流程，源頭端茶菁品質之於收購價格，乃至於茶製品優劣皆具有至關重要的影響。製茶廠於原料收購時根據經驗判斷茶菁分級，並給予相應之收購價格。茶菁分級為製茶流程中位於源頭把關之樞紐，管控茶菁品質可以確保後續茶製品之品質，亦有利於製茶廠與茶農間達成銷售價格之共識。採摘茶菁之品質以其外形、葉片成熟度、枝枒長度等農藝性狀作為評斷指標，而茶菁品質亦影響後續之製程，提前於茶菁採購階段進行分級管控，有助於製茶廠調整製茶條件並發揮茶葉特性，同時也節省後續精製加工成本。常見的茶菁品質判斷方式，多仰賴於人力觀察並以經驗判別，而判別標準包括採收茶菁之茶葉老嫩葉比例、茶菁之長短、葉梗比例等。然以人力判別需仰賴長時間經驗積累，因此判別人力有限，況且該方式具備高度主觀性，過去無普遍在製茶廠與茶農間定義明確統一的標準作為共識，因此難免因認知誤差而在採購端釀成糾紛。

本研究旨建立一明確客觀的茶菁分級系統替代現行的人工分級方式（圖一）。本團隊與臺灣茶業改良場之茶葉專家合作，由專家觀察各產季之茶菁農藝性狀作為分級之依據，如葉片老嫩程度、葉片總數、茶菁總數等，從中找出其中可能影響茶菁品質的特徵，從而將每株茶菁依據品質由高至低分為優質（A 級）、正常（B 級）、欠佳（C 級）三等級。本研究建立之茶菁分級系統以茶菁影像為輸入資訊，搭配機器視覺與深度學習方法辨識單株茶菁所在位置，並提取其農藝性狀，依循前述由專家建立之茶菁分級標準進行分級，以此建立自動、快速且客觀的分級方法。



圖一、茶菁分級系統之應用情境。

本研究提出的茶菁分級系統包含以下軟硬體項目：硬體端有茶菁取像模組及茶菁分級系統主機；軟體端含取像上傳程式、茶菁分級模型、茶菁資料庫、茶菁服務網站等（圖二）。茶菁取像模組用於自動拍攝並上傳待分級茶菁，而後上傳茶菁影像至茶菁分級系統。茶菁分級系統包含茶菁分級模型、茶菁資料庫及茶菁服務網站。系統接收模組上傳之影像即將其輸入茶菁分級模型，由模型辨識與提取影像中單株茶菁、農藝性狀，及其等級。完成茶菁分級後，上述資訊與茶菁影像皆存入資料庫，以便後續提供使用者查詢。使用者可登入茶菁服務網站存取茶菁資料庫以查詢茶菁分級結果與農藝性狀資訊，亦可查看歷史上傳茶菁影像。



圖二、茶菁分級系統架構圖：硬體端拍攝茶菁影像；軟體端辨識茶菁品質。

本研究之茶菁樣本蒐集自2020年至2022年間，於桃竹地區八家製茶廠各季收購茶菁，及茶業改良場魚池分場提供之茶菁樣本。最終共計蒐集 825 張茶菁影像。使用 784 張影像作為模型訓練集，內含多種高複雜度的拍攝背景與場景障礙物干擾；其餘影像作為測試集，共計 770 株茶菁。自蒐集之影像擷取狀態良好未遮蔽之單株茶菁影像作為農藝性狀部位識別資料集，共計 1337 張單株茶菁影像，並依 4:1 之比例切割為訓練集與測試集。參考茶樹生長規律歸納出 7 類特徵，包含茶芽、嫩葉、熟葉、老葉、莖、魚葉及紅梗。由茶樹生長特性，可知茶芽必生長於茶菁頂端，嫩葉、熟葉至老葉存在嚴格由上至下的位置關係，魚葉與紅梗則出現於較長之茶菁的下緣位置，為品質欠佳的特徵。

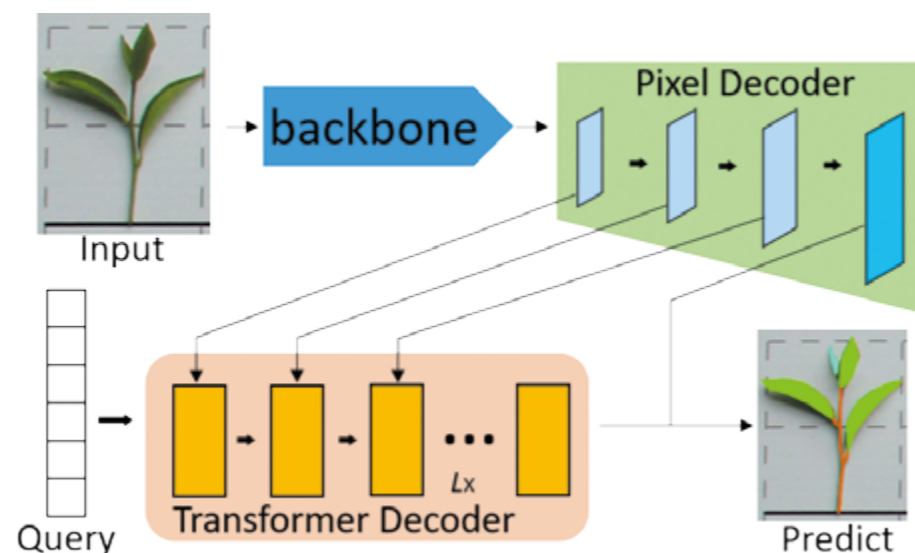
綜上所述，農藝性狀的上下位關係亦為一種資訊，應考慮將此特性納入分級模型中。茶菁分級模型之建置使用Mask2Former深度學習架構(圖三)。該模型可辨識茶菁頂端的細小茶芽，並關注各組特徵間之關聯性，而辨識目標茶菁之特徵間存在先後生長次序之老嫩葉關聯性、茶芽於茶菁頂端以及紅梗與魚葉於底部之特性，因此引入此機制的Mask2Former可適用於本研究之資料特性。

本模型於茶菁識別取得 mAP 達 0.75，AP50 達 0.99，AP75 達 0.96 的表現，足以顯示在大部分情況下的茶菁皆可以被正確的提取出輪廓（圖四）。農藝性狀識別模型在大物件於嫩葉、熟葉與老葉分別取得 mAP 達0.60、0.71及 0.53之辨識效能，小物件於莖、茶芽、魚葉及紅梗取得 AP50 達 0.89、0.51、0.65與 0.48之辨識率。

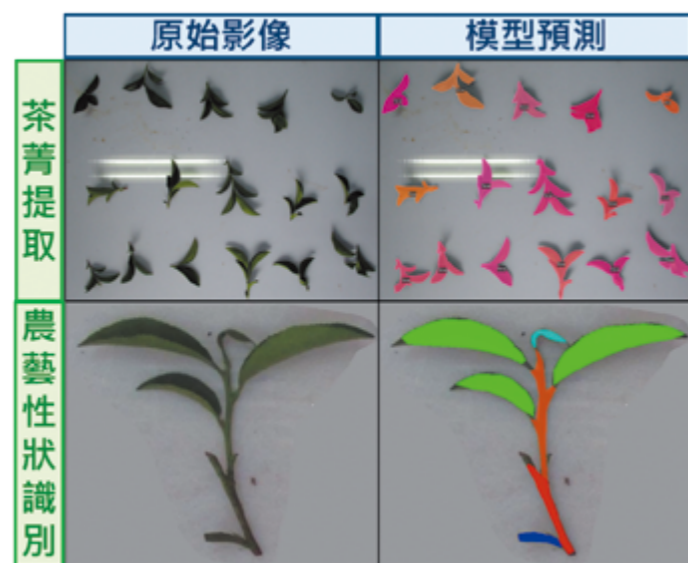


結合兩模型與茶菁分級標準所得之茶菁分級模型可對茶菁進行 A、B、C 三等級之判別。本分級模型在茶菁等級測試集中取得 87.6%之分級準確率，相較於人工分級之 68.8%分級準確率有顯著提升。辨識速度方面，平均辨識速度可達 5.0 秒/張。

本研究成功開發茶菁分級系統一套，本系統包含茶菁取像模組、茶菁服務網站、茶菁資料庫與茶菁分級模型。由茶菁取像模組負責茶菁影像之拍攝與上傳，由分級系統輸入茶菁分級模型進行農藝性狀提取與等級判別，提取之資訊與分級將存入茶菁資料庫以供查詢使用。本分級系統使用茶改場專家所制定之茶菁分級標準，相較於主觀且易混淆的人工茶菁分級方式，本系統使用客觀明確的決策流程進行等級認定，且分級準確度達 87.6%，平均辨識速度為 5 秒/張，足以顯示本分級系統可達客觀且明確的茶菁分級之期望。套用本分級系統於茶廠作業，茶廠人員可於收購茶菁時，利用簡便的操作控制取像模組自動拍照上傳，並於茶菁服務網站查看該批收購茶菁之分級結果。



圖三、Mask2Former深度學習模型架構。



圖四、模型辨識結果。

研究創新性與貢獻度

1 創新性

1.智慧茶業與技術升級

基於茶業專家建立之茶菁分級標準，應用人工智慧技術進行學習而達成自動識別之功效，提供迅速、客觀、準確的茶菁品質評估方式。

2.實務應用之適應性

系統兼顧拍攝硬體設計、軟體模型與資料庫建置，以至友善使用者的網頁服務。茶廠可於系統中設計客製化自訂分級標準模式，以適應實務應用時之可能情境。

3.跨領域團隊共同開發

結合茶廠作業人員需求與建議、茶業改良場專家經驗及田間實務指導，與生物機電工程機電整合及影像處理專長組成跨領域團隊，共同著眼於本研究項目之開發。

2 貢獻度

1.茶葉精製費用的降低

使用茶菁分級系統對商用採收茶菁依品質做分級，可以降低製茶流程中精緻費用10%。若以6家合作茶廠計算，可以節省成本約44,000(仟元)。

2.保障茶菁採購雙方權益

透過茶菁分級系統應用，可建立明確客觀的茶菁分級標準，一方面鼓勵茶農提升種植與採收品質，另一方面保障茶菁之生產端與採購端之權益，協助緩解產銷雙方爭議。

3.減少從業人員作業時間

本研究開發之茶菁識別功能與茶菁服務網站提供茶葉學者做使用，將可減輕專業機構(如：茶業改良場)從事輔導及測試人員之工作負荷以及相關調查所需之試驗時間。



正瀚生技創新獎辦法



111年度第四屆【正瀚生技創新獎】申請辦法

一、宗旨

正瀚生技股份有限公司(以下簡稱本公司)為鼓勵全台農業生技相關領域之學術研發團隊,專心致力於科技創新與探索,特設置「正瀚生技創新獎」(以下簡稱本獎項)。

二、農業生技領域之技術創新與探索範圍包括

1. 基礎理論:認識現象、發現新知識為主之基礎科學研究。
2. 應用創新:以解決現今農業問題為目標之創新應用研究。

三、申請資格

- 學生組:農業生技相關領域在學大學、碩士班及博士班學生,申請時須具備「有效學籍」,申請者可為個人或團隊,同時申請「基礎理論」組與「應用創新」組,第一作者不可為同一人;申請題目以農業生技創新及環境永續之理論研究、應用研究為主,不限於農學院與生命科學院學生,凡以植物生物技術、作物生理、作物遺傳育種、作物生長發育、作物栽培、森林景觀、觀賞園藝、植物保護、肥料及土壤改良、及精準農業設施(包含監測、檢驗或農業應用相關設備與軟體)為跨領域主題均可。
- 青年學者組:
 - (1) 111年12月31日申請截止日前,須任職於國內公私立大學或研究單位,未滿45歲(民國66年12月31日後出生)之青年教師與研究者(女性若生育一胎得延長申請年齡兩年),研究領域為農業生技創新及環境永續之研發成果,例如論文發表篇數、見刊之國際期刊等級、智慧財產權授權狀況等為審核依據。
 - (2) 申請者可由各大專院校農業生技科技系所或研究機構推薦(每單位限一名);或由青年學者/研究者自行申請。

四、本獎項名稱與獎金設置，各獎項取得獎者一名予以獎勵（必要時得從缺）

■ 學生組：

基礎理論組		應用創新組	
正瀚首獎	20萬元(學生)+5萬元(指導老師)	正瀚首獎	20萬元(學生)+5萬元(指導老師)
正瀚銀獎	15萬元(學生)+3萬元(指導老師)	正瀚銀獎	15萬元(學生)+3萬元(指導老師)
正瀚銅獎	10萬元(學生)+2萬元(指導老師)	正瀚銅獎	10萬元(學生)+2萬元(指導老師)
新銳潛力獎	5萬元(學生)+1萬元(指導老師)	新銳潛力獎	5萬元(學生)+1萬元(指導老師)

* 上述四類獎項均給予獎盃一座、獲獎證明一紙；指導老師得獎名稱為「指導獎」。

* 另評審委員會可斟酌增設「優等獎」若干名，頒發獎狀與獎金，但指導老師不再給予獎金。

- 青年學者組：徵選年度優秀青年學者1~2名，每位各得30萬元獎勵金，並將邀請至正瀚生技主辦之研討會上擔任演講者。

五、辦理期間

1. 報名日期：111年11月1日（星期二）起至111年12月31日（星期六）截止收件。
2. 初審日期：預定於112年1-2月間辦理（書面審查）。
3. 複審日期：預定於112年3-4月間辦理（口頭審查）。
4. 頒獎典禮：預定於112年6月底前擇期辦理。

六、申請辦法

■ 學生組：

- (1) 本獎項採報名審核制，申請資格包含個人或團隊，個人若為團隊代表，研究貢獻度須達25%以上（請參閱申請文件說明）。
- (2) 申請者需檢附文件：
 - 申請表
 - 無違反學術倫理法律責任聲明書
 - 指導教授推薦函
 - 在學證明
 - 相關著作或專利（無則免）：著作論文、研討會發表、海報張貼、獲獎紀錄、專利申請、產學合作等傑出事蹟之相關資料。

■ 青年學者組：

- (1) 檢附申請表及自傳各一份。
- (2) 著作目錄，需為111年12月31日以前五年內之出版品，並選定其中3篇為重要著作並檢附全文。著作必須以在國內任職期間發表者(不含學位論文)為限。
- (3) 重大貢獻說明（含基礎研究之創新性及延伸應用，1000字內）。
- (4) 推薦函2封。
- (5) 本組參選人以書面審查為主。

七、學生組評審

1. 初審：申請人提出申請，並繳交上述文件，由本獎項評審委員會進行書面審查。
2. 複審：通過初審之團隊或個人，一人代表口頭簡報研究內容。（報告時間15分鐘、問答時間5分鐘）
3. 本獎項評審委員將遴選國內外農業生技領域專家學者與正瀚生技公司代表共同組成。

八、報名與申請方式

■ 學生組：

- (1) 申請者請自行於報名資訊網頁下載檢附文件。
- (2) 請於收件截止日前，完成各項檢附文件之電子檔，寄至收件信箱chbioia@chbio.com.tw

■ 青年學者組：

- (1) 申請者請自行於報名資訊網頁下載檢附文件。
- (2) 請於收件截止日前，提供相關研究成果之證明，以電子檔寄至收件信箱chbioia@chbio.com.tw

本辦法若有未盡事宜，得修正公布於本公司網站：www.chbio.com.tw

若有任何問題，請與正瀚生技創新獎工作小組聯絡。

連絡電話：049-7009198 ext. 8507 (劉命如)、88211 (林秋琍)、88221 (黃亭瑗)。

電子郵件：chbioia@chbio.com.tw



正瀚生技股份有限公司



正瀚生技主營業務為農業生技新藥研究、開發、生產與銷售。瞄準世界農業市場需求商機、自主創新核心關鍵技術，研發契合現代農業生產需求之高效、精準、低碳的植物生長調節劑與肥料產品。

正瀚生技全球研發中心位於南投中興園區，研發團隊匯集海內外主要大學或頂尖研究機構之生物學、農學、化學等領域的碩博士優秀人才，共同貢獻開發各項新產品，戮力實現「生根臺灣，走向世界」的願景。

正瀚生技在南投中興園區建置設施完備的全球研發中心，中心架構分為「中央實驗區」、「功能實驗區」及「GLP實驗區」。三大區塊功能設備無縫接軌，可同時進行試驗資料收集及反饋修正，整合多面向資料，針對主流產品進行功效和藥害評估以提出升級和解決方案。

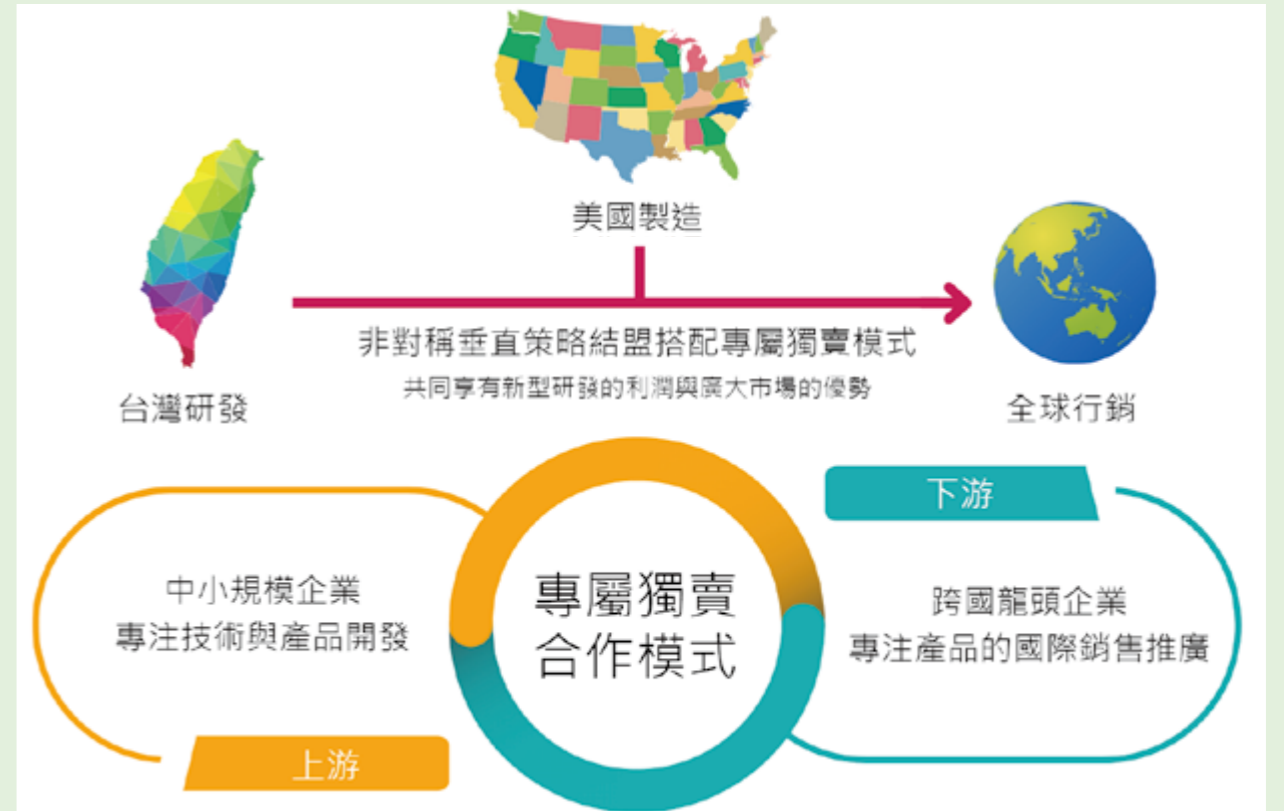
正瀚生技持續不斷積極延攬臺灣學術界孕育的高階人才，並產學聯合培養產業專業人才，藉此提升臺灣農業生技新藥開發的軟實力。



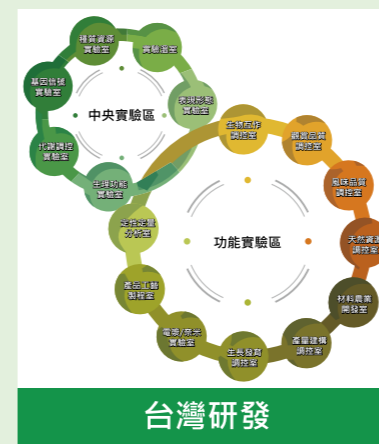
正瀚生技公司的研發總部設在中興園區外，尚有位於美國加州的子公司做為生產製造中心，及新設廠區(位於彰濱工業區)作為農業剩餘(廢棄)物之醱酵工廠，進行農業循環經濟產品開發。



正瀚生技採用創新經營模式包括：採取「非對稱垂直策略結盟」搭配專屬獨賣模式，與通路商合作將利潤最大化；「台灣研發、美國製造、全球行銷」之策略佈局讓研發到銷售之間多環節皆具有優勢；建立全球藥證登記管道，開發多元市場。



正瀚生技與美國最大農化產品銷售公司Nutrien等通路商進行策略結盟，在全世界銷售。





吳正邦董事長提到：「正瀚產品都是自主研發，研發本身就在做discover，不一定會成功，但成功後享有很高的技術性毛利，產品要有特色才能跟國際競爭。」農化產品開發根據技術水準可分為學名藥（Me too 產品）、化學技術（原廠藥）及生物學三個層次，正瀚生技產品皆為自主研發的農業生技新藥，不模擬與仿照失去專利保護的藥品，而成功開發新藥的關鍵是正瀚生技擁有**三項核心的關鍵技術：精準化新藥開發、全功能驗證平台、完整的田間試驗。**

正瀚生技最重要的生命力，就是持續保持研發創新性與獨特性，並自許成為國際級農業生技新藥研發型企業。希望藉由一己之力，影響台灣農業生技產業；集眾人之力，讓台灣成為改變全球農業的新支點：「生根台灣、走向世界」。

董事長

吳正邦



頒獎花絮





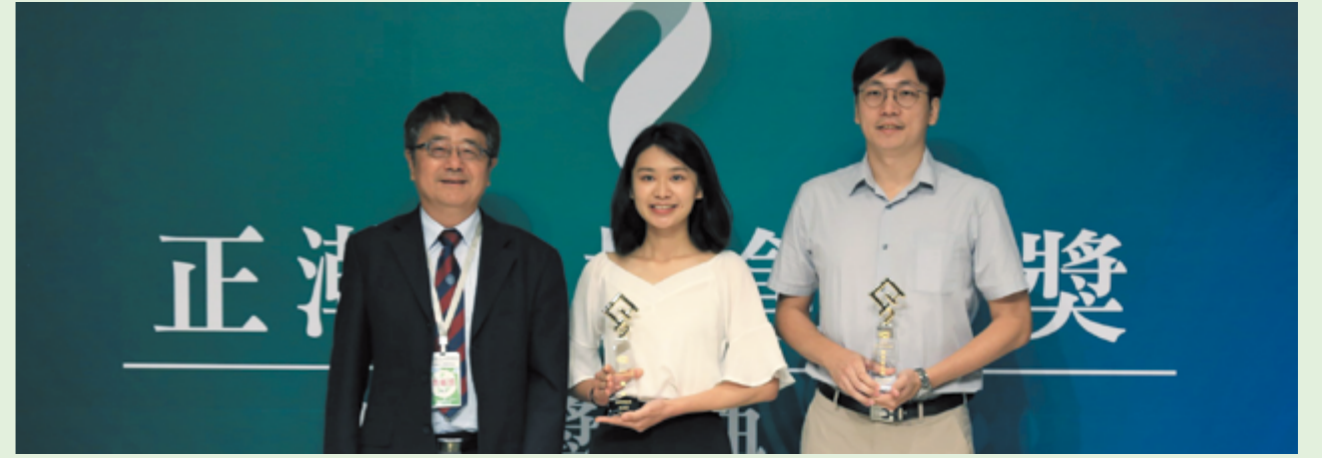
正瀚生技創新獎得獎者大合照



觀眾提問



青年學者蔡怡陞專題演講





正瀚生技創新獎

CH BIOTECH INNOVATION AWARD

第四屆表揚實錄

出版者:正瀚生技股份有限公司

發行人:吳正邦

聯絡處:正瀚生技創新獎工作小組

地址:南投縣南投市文獻路89號

電話:(049)7009198

中華民國112年08月15日





正瀚生技
股份有限公司

CH Biotech R&D Co.,Ltd.

www.chbio.com