

微生物體學

於營造洛神葵有機與友善環境耕作之運用

文 / 圖 王誌偉

前言

為執行科發基金「提高農產品品質及櫥架壽命」之子計畫「新興技術-微生物體學(Microbiome)於營造洛神葵有機友善環境耕作之應用」研究，赴美國堪薩斯州立大學生物學系Sonny T.M. Lee助理教授實驗室參訪，學習Lee教授在土壤微生物菌相的研究專長與經驗，從研究計畫構思、材料取得、試驗設計、使用的相關技術、實驗方法與資料分析等全方位的學習，以期未來將其經驗與技術應用於營造洛神葵等作物有機與友善耕作的土壤環境等相關試驗研究。

環境基因體學(metagenomics)的概念

要了解什麼是環境基因體學要先知道microbiota(微生物相)的定義，microbiota泛指「一群」棲息在植物或動物體內部與表層，或是環境中(例如土壤、深海、居住物等)，肉眼看不見的微小生物。這些微小生物包括了細菌、真菌、病毒或原生生物，其與宿主之間發展出互利共生(symbiosis)、片利共生(commensalism)或致病(pathogenesis)關係。環境基因體學(metagenomics)指的是研究從環境中獲取的基因體遺傳物質，從土壤、水、人體腸道組織或甚至外太空等環境中萃

取微生物的核酸物質，經過大量的定序與生物資訊分析後，以瞭解這些微生物的菌種組成與比例等資訊(圖1)。Metagenomics可以用targeted metagenomics(標的環境基因體學)和shotgun metagenomics(霰彈槍環境基因體學)兩種方法，以次世代定序為基礎來進行研究，研究的步驟如圖2所示。Targeted metagenomics的方法是先利用聚合酶連鎖反應(PCR)將微生物基因體特定區域的片段專一性增幅後進行定序，例如，最常使用的是微生物16S rRNA 基因，shotgun metagenomics則是將環境微生物DNA萃取出來後，直接將DNA片段打碎成小片段後進行定序，最後再將小片段組合成各個微生物的基因

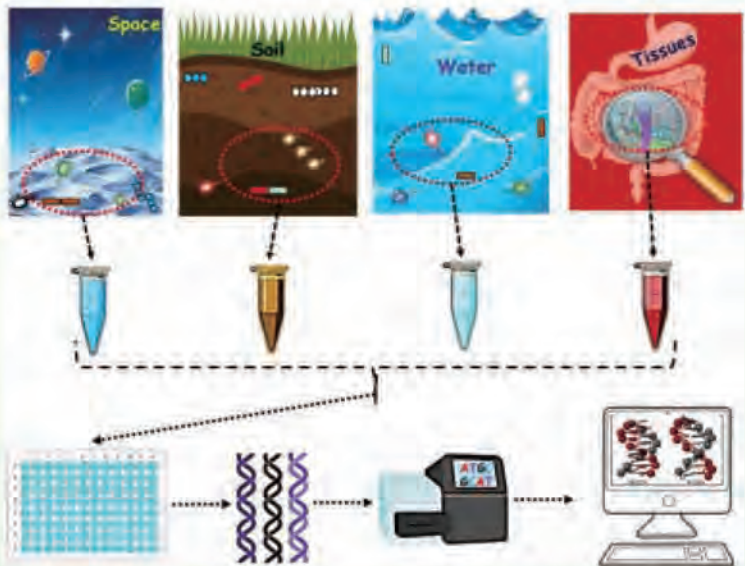


圖1.環境基因體學(metagenomics)研究示意圖

(圖片引用自以下網址：<https://www.sciwri.club/archives/7530>)



圖2. 環境基因體學(metagenomics)兩種常用的實驗方法與步驟
(圖片引用自下列網址：<https://www.sciwri.club/archives/7530>)

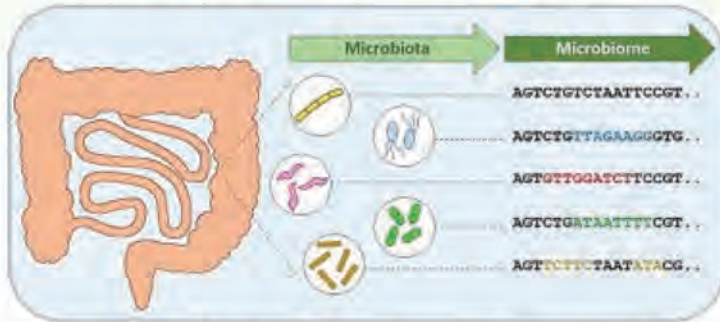


圖3. 以人體腸道微生物為例說明Microbiota跟Microbiome兩個重要詞彙定義的差異(引用自NHRI communications第733期)

體，此法可提供的資訊較為完整，可知該微生物在群體中的生物功能為何。Lee教授認為我們常用的16S rRNA基因進行環境微生物體學的技术(以下簡稱16S)已經過時，因為16S只看微生物基因體的特定片段，能看到的環境微生物的解析度太低，只能知道樣本中哪個微生物屬等級分類地位的種類比較多或比較少，他認為要用shotgun metagenomics的方法才符合未來趨勢。舉例而言，美國菌種保存中心(ATCC)收集的大腸桿菌菌株有多達30多株標準菌株，其中有些具致病性、有些則沒有，如只用16S的方法來看這些菌株，結果呈現會全部都相同，沒有鑑別力。但是如果用shotgun metagenomics的方法，

就有辦法區分樣本中的大腸桿菌是否為具有致病力的菌株，亦可知道環境微生物中確切哪個微生物種或種以下的分類地位(例如品系，strain)所扮演重要角色。但是要做到shotgun metagenomics則要花較大的成本進行更高通量的次世代定序，礙於成本問題，能分析的樣本數量較少，且需要的生物資訊處理能力更高，此兩種方法各有其優缺點。Lee教授建議進行研究時可以先收集好大量樣本，利用16S進行初步分析，如果看到值得進行shotgun metagenomics的樣本時，可再進一步深入研究。另一個常見的名詞-微生物體(microbiome)一詞源自 metagenome，在

2001年由微生物學家Joshua Lederberg (1958年諾貝爾獎生醫獎得主)建議使用：凡以「基因體」為角度論述微生物相者即可稱為微生物體。簡單來說環境中形形色色的微小生物們所形成的生態群落稱為microbiota，若利用序列分析方法，將這些微生物集體基因組定義，則另稱為微生物體(microbiome) (圖3)。

Sonny T. M. Lee教授實驗室研究之介紹

Lee教授實驗室目前有1位印度籍博士後研究學者、2位博士班研究生與4位大學部的專題生，另外近期還會有一位研究助理，以研究人力來說，是臺灣一般研究室的人力，不過Lee教授研究的領域跨越相當廣，包括豬的腸道菌相、人

類的腸道菌相與堪薩斯大草原重要草種 (Big bluestem) 的菌相研究。本段介紹在此草原上重要草種之抗旱相關研究為主。

Lee教授的前輩Loretta C. Johnson利用易地種植超過10年的試驗，發現環境因素的改變讓Big Bluestem不同的生態草種改變其性狀，Lee教授則是從根圈與葉表微生物相的角度來觀察這些變化，以應用的角度而言，瞭解何種微生物可以讓Big Bluestem草種變得比較耐旱，未來可應用此微生物的添加，讓乾旱地區的草原復育能更加成功。但要達到此目標，需要好幾個基礎的研究才能達成。首先，他們必須先從溫室實驗的材料分析耐旱與不耐旱的微生物相差異，依初步的數據確實看到一些微生物相的差異，之後利用換土的實驗，探討是否因土壤的因素讓草種變得耐旱，同時分析微生物相的改變。上述實驗都完成後，才會進一步在野外進行相同的實驗，探討野外發生的改變是否也與溫室相同。私底下詢問Lee教授未來的目標是否為研

發出一種或數種微生物添加劑，可以讓Big bluestem抵抗耐旱環境，Lee教授坦承，微生物相分析確實可以找到一些菌種上的差異，但是這些菌種是否能成功分離培養出來，並且添加到作物土壤就可以成功達成我們要的耐旱表現，他認為這樣的目標變因太多，學術研究還是以科學的方法進行現象的探討為主。

本次參訪獲Lee教授同意參觀其實驗室環境設備(圖4)，抽取土壤DNA的儀器如圖5，機型為MP Super Fast Prep-2，為手持式的振盪器，可調整震盪速度，一次只能容納兩個樣本的試管(圖5)。他們使用的土壤DNA抽取試劑套組為OMEGA的E.Z.N.A.®Soil DNA Kit(圖6)，據Lee教授的說法，本試劑套組的價位較低、效果佳，文獻上常用的則為QIAGEN的power soil kit。

生物資訊分析與圖表製作-以洛神葵土壤根圈樣本之次世代定序資料為例

為執行本計畫「新興技術-微生物體學(Microbiome)於營造洛神葵有機友善環境耕作之應用研究」，在臺東轄區3處



圖4.實驗室環境及設備



圖5.萃取DNA所使用的手持式破菌設備



圖6.萃取土壤DNA所使用之套組與現場操作情形

不同洛神葵田區進行根圈土壤採樣，每田區採集10株已出現萎凋病徵的植株之根圈土壤，並採集10株無病徵的健康植株作為對照，總共採集60個土壤樣本。進行土壤DNA萃取與16S rRNA V6-V8變異區間的專一性增幅(圖7)。藉由筆者在中央研究院的指導教授-湯森林老師實驗室與本次參訪的Lee教授的協助下，完成了定序資料的資料分析，以NMDS統計分析樣本間微生物族群的組內與組間差異(圖8)後發現，來自太麻里荖葉園改種洛神葵田區(藍色標誌)，其樣本分佈較密集，表示田間的微生物相差異度較小，推測可能是荖葉園長期以密集施

用化學農藥與化學肥料的耕作下，導致土壤微生物相貧瘠。再者，從採樣時土壤的分析(表1)也可以看出此區土壤的磷(P_2O_5)、鉀(K_2O)、鈣(CaO)、銅與鋅等含量皆比另外兩個試驗田區高出許多。相對的，知本有機專區的土壤(綠色標誌)樣本的分佈範圍較廣，表示其樣本間的微生物相的差異度較大，推測有機耕作方式下，土壤微生物相較為豐富。另外，知本有機專區的萎凋病株(綠色標誌)點狀分佈較集中，顯示罹病植株之微生物相趨於相似且相較於健康植株較單一，以微生物相的角度來觀察罹病植株如此單一且相似的現象亦是合理。本場洛神葵試驗田的土壤樣本(紅色標誌)與知本有機專區的分佈比較類似，但分佈範圍較知本土壤稍偏窄，推測可能是本場的試驗田管理採取一般合理化的施用化學農藥，因此微生物相的豐度較有機專區低，但明顯比荖葉園轉作洛神葵之田區高。本研究以微生物相分析提供科學數據證實，長期的施用化學農藥與肥

料的耕作下，土壤微生物相會趨於貧瘠，有機專區的微生物相較為豐富，適合以此區土壤來進行拮抗微生物分離、篩選的材料。



圖7. 洛神葵微生物體學研究之採樣流程與target specific metagenomic之實驗流程

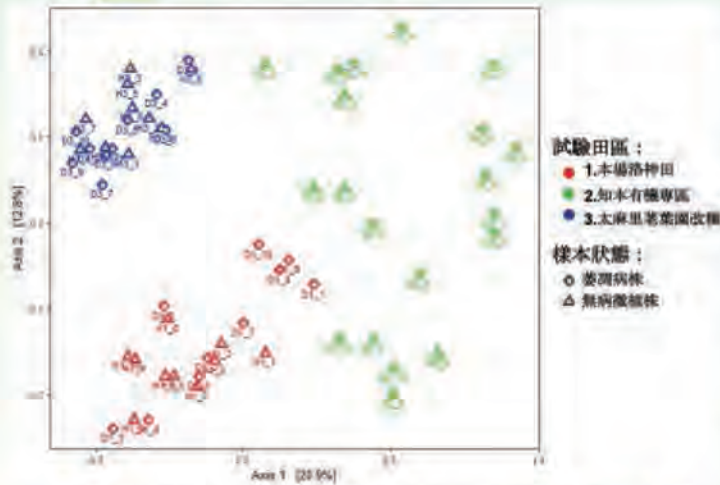


圖8.NMDS統計分析樣本間微生物族群的組內與組間差異

結語

本次參訪堪薩斯州立大學生物學系 Sonny T.M. Lee 助理教授實驗室，Lee 教授在微生物體學有相當豐富的研究經驗，研究過的材料包括海洋、珊瑚、人體腸道和草原土壤等，領域橫跨的範圍相當廣泛。生物資訊的分析方面，Lee 教授有相當豐富的經驗與獨特的方法，榮獲堪薩斯州立大學生物學系的青睞而獲聘為助理教授，並給予優渥的研究經費進行堪薩大草原草種耐旱、生態等相關的研究。Lee 教授在攻讀博士學位時和中央研究院生物多樣性中心湯森林研究員有密切的合作關係。藉由本次參訪，將此合作關係延伸到臺灣的農業界，筆者已經和 Lee 教授有一些合作的

研究正在進行，希望未來能持續且建立更深入的合作關係。

微生物體學在國內農業應用方面的研究相對較少，筆者認為有相當多題材都可以使用微生物體學作為工具來進行。例如，如何營造健康的土壤微生物環境、微生物農藥施用於環境後對土壤微生物相的影響、作物病害發生時微生物相的變化、作物抗病或園藝性狀優良品種所營造的微生物相等，國外文獻已有許多這方面

的研究，亦找到一些特別的微生物菌種可以幫助作物抵抗病害。有文獻報導某個抗病的番茄品系，其根圈會特別吸引一個特定的微生物菌種來幫助其抵抗病害。筆者相信國內各農研單位(如各轄區試驗改良場等)都有許多珍貴的題材，但是微生物體學的研究除了前段試驗設計與材料收集、核酸萃取與昂貴的次世代定序，得到大量的序列資料後，更需要後端專業的生物資訊分析來解讀其中的奧秘，但國內農研單位在生物資訊分析的能力普遍不足，因此建議政府農研單位與大專院校教師建立合作關係，共同發揮所長。

表1. 臺東3處洛神葵採樣地點之土壤分析結果

| Soil sample | Location | pH | Organic matter % | P ₂ O ₅ mg/kg | K ₂ O mg/kg | CaO mg/kg | MgO mg/kg | EC mS/cm | Fe mg/kg | Mn mg/kg | Cu mg/kg | Zn mg/kg |
|-------------|--------------|------|------------------|-------------------------------------|------------------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| I | Taitung city | 6.81 | 1.97 | 157.94 | 93.91 | 2,120.80 | 116.96 | 0.04 | 318.42 | 46.34 | 7.62 | 5.08 |
| II | Zhiben | 6.30 | 3.01 | 196.47 | 56.59 | 2,275.89 | 147.03 | 0.08 | 724.39 | 94.27 | 11.38 | 3.89 |
| III | Taimali | 6.99 | 2.44 | 1,078.92 | 116.44 | 6,049.35 | 165.31 | 0.06 | 241.21 | 89.12 | 29.59 | 36.63 |