

出國報告（出國類別：研習）

微生物菌種分離定量、型態及分子生物 鑑定技術研習

服務機關：行政院農委會高雄區農業改良場
姓名職稱：張耀聰助理研究員
派赴國家：美國
出國期間：99年8月28~9月09日
報告日期：99年12月8日

出國報告審核表

出國報告名稱：育種、栽培設施及生物技術農業科技人才培育計畫-微生物菌種分離定量、型態及分子生物鑑定技術研究		
出國人姓名(2人以上,以1人為代表)	職稱	服務單位
張耀聰	助理研究員	行政院農業委員會高雄區農業改良場
出國類別	<input type="checkbox"/> 考察 <input type="checkbox"/> 進修 <input checked="" type="checkbox"/> 研究 <input type="checkbox"/> 實習 <input type="checkbox"/> 其他 _____ (例如國際會議、國際比賽、業務接洽等)	
出國期間：99年8月28日至99年9月9日		報告繳交日期：99年12月8日
計畫主辦機關審核意見	<input checked="" type="checkbox"/> 1.依限繳交出國報告 <input checked="" type="checkbox"/> 2.格式完整(本文必須具備「目的」、「過程」、「心得及建議事項」) <input checked="" type="checkbox"/> 3.無抄襲相關出國報告 <input checked="" type="checkbox"/> 4.內容充實完備 <input checked="" type="checkbox"/> 5.建議具參考價值 <input checked="" type="checkbox"/> 6.送本機關參考或研辦 <input type="checkbox"/> 7.送上級機關參考 <input type="checkbox"/> 8.退回補正,原因: <input type="checkbox"/> 不符原核定出國計畫 <input type="checkbox"/> 以外文撰寫或僅以所蒐集外文資料為內容 <input type="checkbox"/> 內容空洞簡略或未涵蓋規定要項 <input type="checkbox"/> 抄襲相關出國報告之全部或部分內容 <input type="checkbox"/> 電子檔案未依格式辦理 <input type="checkbox"/> 未於資訊網登錄提要資料及傳送出國報告電子檔 <input checked="" type="checkbox"/> 9.本報告除上傳至出國報告資訊網外,將採行之公開發表: <input checked="" type="checkbox"/> 辦理本機關出國報告座談會(說明會),與同仁進行知識分享。 <input type="checkbox"/> 於本機關業務會報提出報告 <input type="checkbox"/> 其他 _____ <input type="checkbox"/> 10.其他處理意見及方式:	
審核人	一級單位主管	機關首長或其授權人員
		

說明：

- 一、各機關可依需要自行增列審核項目內容，出國報告審核完畢本表請自行保存。
- 二、審核作業應儘速完成，以不影響出國人員上傳出國報告至「政府出版資料回應網-公務出國報告專區」為原則。

摘要

本計畫研習目的，旨在學習國外對微生物菌種分離定量、型態及分子生物鑑定之技術，以利將此技術引入國內，並運用於相關之研究，且開發國際合作之契機。研習之微生物菌種以菌根菌為主，於美國西維吉尼亞大學INVAM中心進行，由菌種分離、篩選、定量、及型態鑑定，到利用分子生物技術進行菌種分類，進行一連串之學習。在菌種分離上，有別於國內40%糖液離心方式，以20%及60%之糖液濃度進行孢子分離，能達到更加分離效果；而篩選菌種以凹玻璃集中菌種，可在鏡檢之篩選及定量上，達到省工之效果；在型態分類方面，利用Melzer's Reagent及Polyvinyl-Lacto-Glycerol進行染色及永久玻片製作，利於孢子細胞壁層及表面型態觀察，作為菌種型態鑑定之依據；在分子生物技術鑑定方面，利用18S nrRNA基因體片段進行89個菌株分類出75個菌種，並將其重新分出4目（Glomerales、Diversisporales、Archaeosporales、Paraglomerales）。此外，藉由實際操作與面對面問題之探討，能更清楚菌根菌種屬間之分辨，及菌種型態鑑定，並藉由此次研習機會確立5種菌根菌種*Glomus etunicatum*, *G. intraradices*, *G. spurcum*, *G. mosseae*及 *Entrophospora Kentinesis*。在外生菌根菌種方面，亦發現4種食用菌種，但礙於無法現場分離保存，無法輸入。

關鍵詞：菌種分離、篩選、定量、型態鑑定、分子生物鑑定

目錄

項	頁
次	次
一、 前言-----	5
二、 研習目的-----	6
三、 行程表-----	7
四、 研習過程介紹-----	8
五、 心得與建議-----	26
六、 附件-----	27

一、前言

微生物在生態體系中佔有極重要之地位，在環境生態平衡方面，所謂物物相關動態平衡，指的就是各物種間各司其職，而微生物在環境中扮演著分解者的角色，它們能循環生物圈中被固定的養份，使養份可以在不同生物中流動。另外，微生物在於人類的意義及用處上可說是一種“共生”關係，舉凡食物、醫藥及生活用品等，無一不與微生物有關。而微生物在農業應用上亦相當廣泛，如會與植物共生，而固定空氣中氮素供植物利用之根瘤細菌及根瘤放線菌，還有菌根菌等相關微生物，這些共生型的微生物，從被發現及廣泛運用於農業使用，至今均有上百年歷史，且國外早於市面上均有相關商品化產品行銷。而反觀國內，自2004年起農糧署才開始委託中興大學土壤環境科學系等教授，研擬草案制訂微生物肥料管理辦法，此草案經6年之規劃，終於在2010年7月29日修訂肥料登記證申請及核發辦法後，才正式將微生物肥料類公告，致使未來微生物肥料商品將有法源依據，因此正式商品與種類，未來將會逐漸正式公告上市。

二、研習目的

微生物肥料為國內積極發展之農業資材項目，更是有機農業中，極受重視之一環，其中菌根菌之應用技術，在國內外之研究，均顯現出對於作物生長有極顯著之成效，但國內目前相關之研究學者均著重於菌根菌之應用，或純粹進行分子生物之鑑定，對於傳統型態鑑定之能力較為不足，且相關分類之學者也紛紛已達退休年齡，目前已出現嚴重斷層，且在菌根菌新種之鑑定上之發表，目前需要傳統型態與分子生物之鑑定才能有較佳之證據支持，有鑑於此需急需進行相關資訊蒐集，並建立國際合作關係，以利此一學門能均衡發展，而本研習計畫即以菌根菌種為目標，進行微生物菌種分離定量、型態及分子生物鑑定技術之研習，以利該項技術，未來能應用於國內農業產業發展。

三、行程表

微生物菌種分離定量、型態等鑑定技術研習
計畫名稱：育種、栽培設施及生物技術農業科技人才培育計畫
(計畫編號：99 農科-4.1.1-高-K1)

日期	行程	住宿
8/28(六)	1. 屏東－高雄小港機場(21:10)出境－桃園國際機場中華航空－美國舊金山(19:50)入境 2. 舊金山國際機場(22:42)出發搭乘美國聯合航空－華盛頓杜勒斯機場	飛機
8/29(日)	1. 到達美國華盛頓杜勒斯機場 2. 美國華盛頓杜勒斯機場－美國 Morgantown 機場(13:50)－到達西維吉尼亞大學	匹茲堡 摩爾根城
8/30(一)	1. 西維吉尼亞大學進行課程訓練 2. 進行菌種鑑定課程訓練	匹茲堡 摩爾根城
8/31(二)	1. 西維吉尼亞大學 2. 進行實務菌種分類課程訓練	匹茲堡 摩爾根城
9/1(三)	1. 早上離開西維吉尼亞大學－出發到達華盛頓杜勒斯機場－轉機抵達亞特蘭大國際機場－再轉機晚上抵達奧爾巴尼機場 2. 由公路交通達喬治亞州(Georgia)Ichauway 城市	亞特蘭大
9/2(四)	1. Joseph W. Jones Ecological Research Center 研習 2. 進行土壤微生物生態相關課程研習	亞特蘭大
9/3(五)	1. Joseph W. Jones Ecological Research Center 研習 2. 進行土壤微生物生態相關課程研習	亞特蘭大
9/4(六)	喬治亞州奧爾巴尼機場－亞特蘭大機場－佛羅里達州的羅德岱堡國際機場	邁阿密
9/5(日)	佛羅里達熱帶果樹農場研習	邁阿密
9/6(一)	佛羅里達熱帶果樹農場研習	邁阿密
9/7(二)	1. 羅德岱堡機場－紐約甘乃迪機場出境 2. 紐約甘乃迪機場－安克治	飛機
9/8(三)	1. 紐約-安克治	飛機
9/9(四)	1. 安克治到達台灣桃園國際機場 2. 桃園國際機場－高雄國際機場－屏東	

四、研習過程介紹

INVAM Center 介紹

本次研習地點，位於美國東岸地區，西維吉尼亞州摩爾根城之西維吉尼亞大學內進行，在該大學之土壤與植物學系，位於 South Agricultural Sciences Building 一樓設有國際菌根菌種保存中心 (INVAM Center)，該中心設有中心主任一位，由 Dr. Joseph B. Morton 教授主持；專業技術人員 Bill W. Wheeler (已於該中心服務 19 年) 負責菌種繁殖工作，另外 Morton 教授指導博士班研究生有二位為 Robert Bills 先生和 Sonia Purin 小姐。



圖 1. INVAM 中心外觀



圖 2. Morton 教授 (右 1) 與其博士班研究生 Robert 先生 (左 1) 與 Sonia 小姐

該中心設有一間大型 4°C 之儲藏存室，專門保存蒐集來自世界五大洲各地之菌根菌種，目前蒐集之菌株約 980 株計有 75 種，並設有一露天玻璃溫室 (溫控 23~31°C) 及一間室內培養室 (溫控 23°C) 進行菌根菌種繁殖培養，主要是以蘇丹草、玉米及高粱作物為宿主，進行菌根菌孢子繁殖，其培養介質以二氧化矽與壤土 1:1 比例混合，且介質均經 90°C 滅菌 24hr，自然冷卻後進行使用，而培養容器主要以穴植管 (內徑 5 cm×長 21 cm) 為主，另外亦使用塑膠盆鉢 (內徑 12 cm×深 15 cm) 作為無菌苗繁殖，容器滅菌以 3% 次氯酸鈉進行 90min 浸泡後清洗使用。



圖 3. 大型低溫儲藏室，保存世界各地蒐集之菌種。



圖 4. Bill 於低溫儲藏室介紹菌種保存方式。



圖 5.蒐集菌株均使用密封袋密封並進行編碼。



圖 6.露天玻璃溫室主要以盆鉢及大型穴植管繁殖孢子接種源。



圖 7.室內溫室以鹵素太陽燈進行宿主培養。



圖 8.室內培養主要以穴植管為主，進行孢子定量接種。

(一) 菌根菌種分離培養及定量接種

在 INVAM 蒐集之菌種均有計畫進行菌種繁殖培養，首先將經上述方式處理之介質，再經接種培養約 3 個月後，將穴植管宿主植物取出，並以不鏽鋼剪刀，減取根系密集部分（含土壤），定量於 50mL 之塑膠杯中，並將含根系與介質之樣品，置於果汁機中加入少許去離子水，以高速旋轉約 10~15 sec，將根系片段與孢子分離，並以濕篩法進行孢子篩分，篩網孔徑大小分別為上層 500 μm ，底層為 38 μm 之篩網，將懸浮於果汁機內上層懸浮液，倒經篩網進行水洗過篩，並將底層篩網蒐集之孢子及部分介質，集中刮入內含 20% 及 60% 之糖液梯度溶液之離心管中，再將其置於 2000rpm 下離心 2 min，此時孢子將被離心置於 20%~60% 之間，再將其倒到 38 μm 之篩網內，以清水將糖液洗淨，約進行 3 次後，即可分離取得孢子。此方法與國內慣行操作方式不同處，在於菌根與孢子分離方式，國內多數均以強力水柱沖洗分離菌根與孢子，而後不同梯度糖液離心，可簡化篩孢流程及縮短操作時間。



圖 9.培養 3 個月之苗木，從穴植管中取出，以不鏽鋼剪刀，減取根系密集部分。



圖 10.將根系與土定量至 50mL 塑膠杯中。



圖 11.高轉速果汁機使孢子與根系快速分離。



圖 12.利用水柱沖力與不同篩網，將孢子分離。



圖 13.利用不同濃度梯度之糖液進行孢子分離。



圖 14.將經果汁機分離之孢子懸浮液到入糖入中，進行糖液離心。



圖 15.利用離心將土壤與孢子分離。



圖 16.經離心後孢子（中間）與土壤（下層）明顯分層。

（二）菌根菌種純化培養

此後將糖液離心後中間層孢子，以濕篩法將土壤中菌根菌孢子分不同粒徑大小（120、200 及 400mesh）進行篩分，則以格線法進行孢子數計算，統計其產孢能力，另外再從解剖顯微鏡下，挑取大小相近、齡級相同之孢子 1~200 個置於 96 孔之微孔盤中，並將其接種至由塑膠盆鉢培養約 2 週之玉米半無菌苗根系上，再以吸管吸取單孢或多孢，將孢子接種於 3 株玉米根系上，並定植於穴植管中進行培養，培養期間每日以去離子水 25mL 澆灌，並且每月進行 $N:P_2O_5:K_2O = 15:5:25$ 稀釋 1000 倍，進行施肥，此部分培養與國內進行之營養液調配，有非常大差異，國內配置營養液著重於 3 要素外，對微量要素要求更是面面俱到，但該中心僅著重於 3 要素之補充，而將植物養分磷含量控制較低，以利產孢。



3 seedlings with roots intertwined



Spores (1-200) collected from microtiter well



Spores pipetted along surfaces of roots

圖 17.孢子定量接種流程



圖 18.篩選之孢子齡級不同顏色也不同。

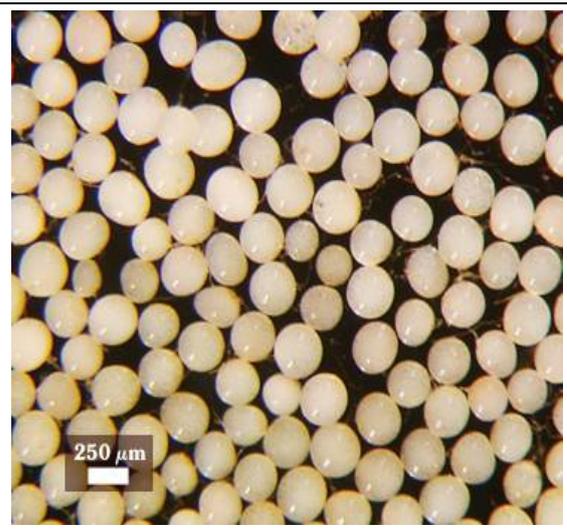


圖 19.健康孢子顏色較淺。

(三) 菌根菌種型態分類

菌根菌種型態分類均以孢子產生方式不同，進行型態上之辨別，約略如下表所示。共分為 5 科 7 屬，其中巨大孢子屬 (*Gigaspora*) 及盾蓋孢子屬 (*Scutellospora*)，所形成之菌根，僅會有叢枝體 (arbuscules) 產生，不會有有胞內囊 (vesicle) 產生，但其根外菌絲則具有輔助細胞 (Auxiliary cells)，此與其他 5 屬之型態不同，而外觀型態依其孢子大小、顏色及孢子發芽管生長發育方式，孢子單獨產生或形成孢子果，此等外觀型態均為鑑定之依據。

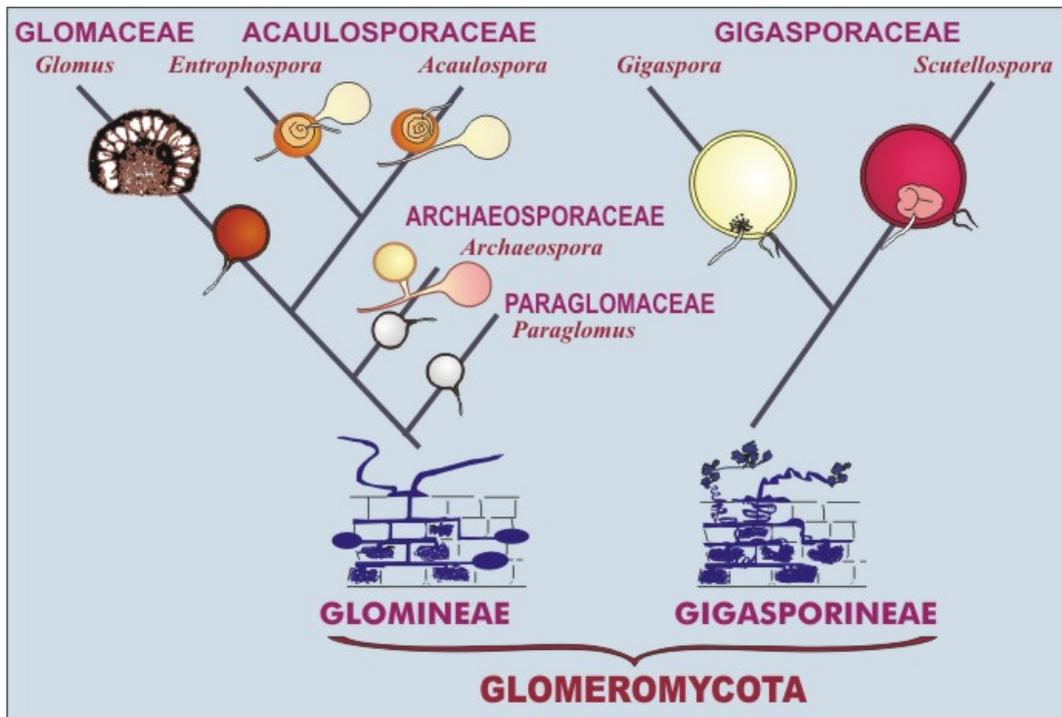


圖 20.叢枝菌根菌型態分類

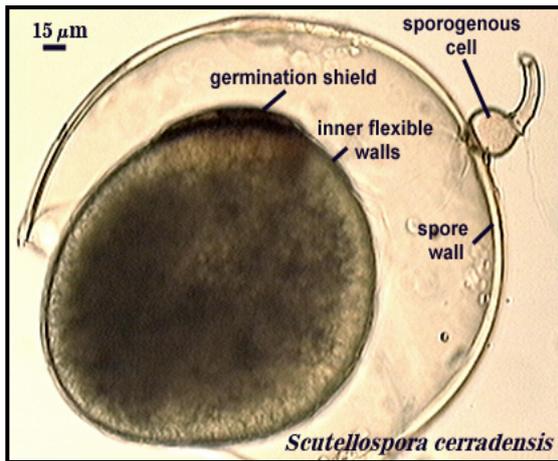


圖 21.盾蓋孢子屬孢子外觀

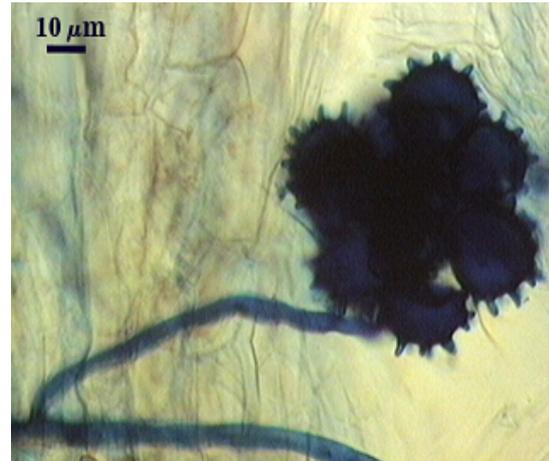


圖 22.巨大孢子屬具有乳凸狀之輔助細胞

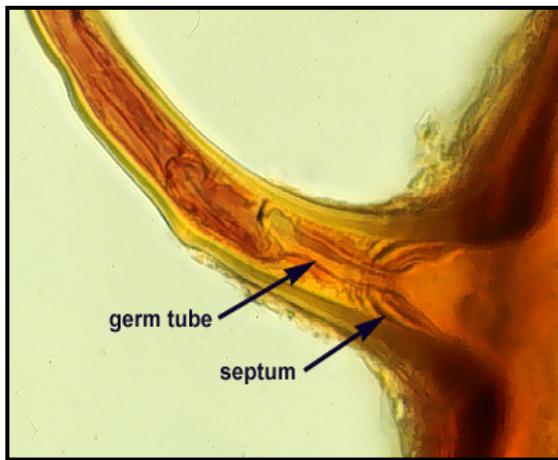


圖 23.繡球菌屬發芽管型態



圖 24.巨大孢子屬發芽管型態

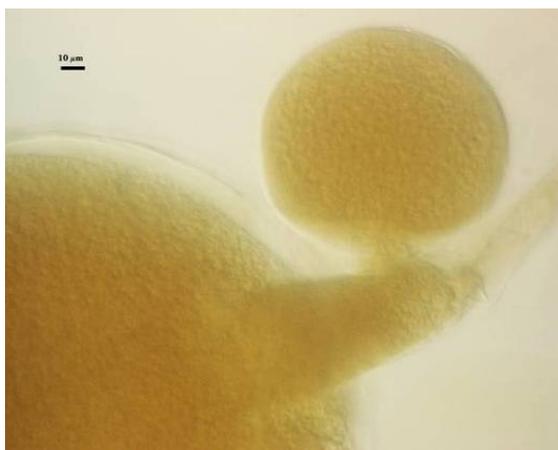


圖 25.無柄孢子屬產孢型態



圖 26.內柄孢子屬產孢型態

(四) 菌種鑑定

菌種鑑定主要依據外觀型態進行屬之分類後，再進行菌根菌孢子壁之鑑定，依其孢子壁之不同時期發育情形，進行分類鑑定依據，而其方式則將菌根菌孢子利用梅氏試劑 (Melzer's Reagent) 及 PVLG (Polyvinyl-Lacto-Glycerol) 進行孢子染色，孢子壁與梅氏試劑反應後，各孢子壁層則分層會較於明顯，易於進行判別，此外孢子壁表層型態，亦是種間鑑定之依據。

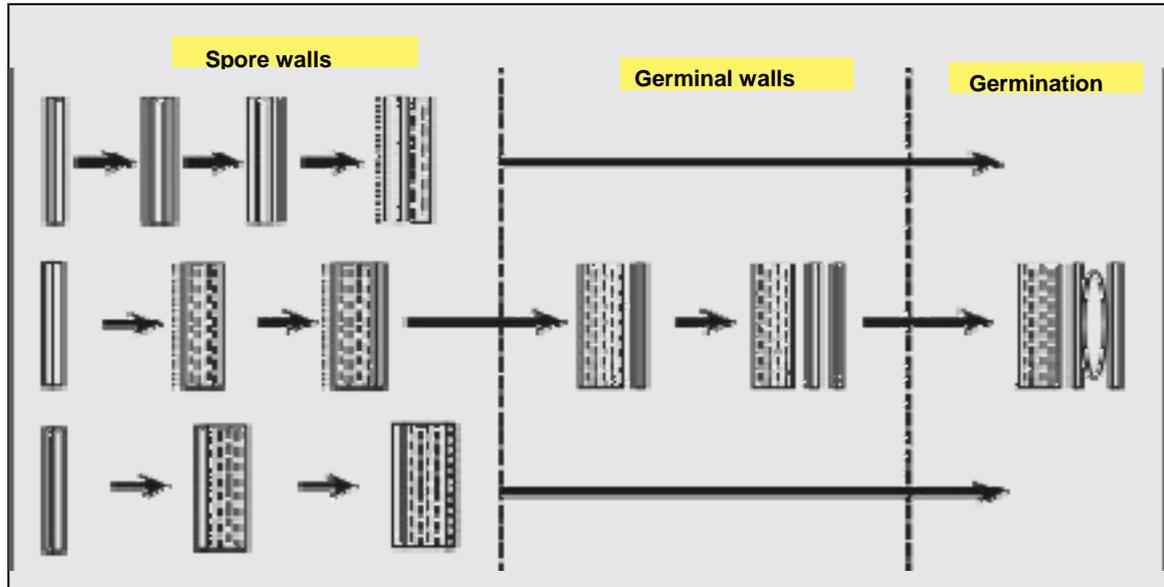


圖 27.不同發育時期孢子壁之型態



圖 28.孢子壁表面型態亦為鑑定菌種之依據 (*Entrophospora Kentinesis*)。

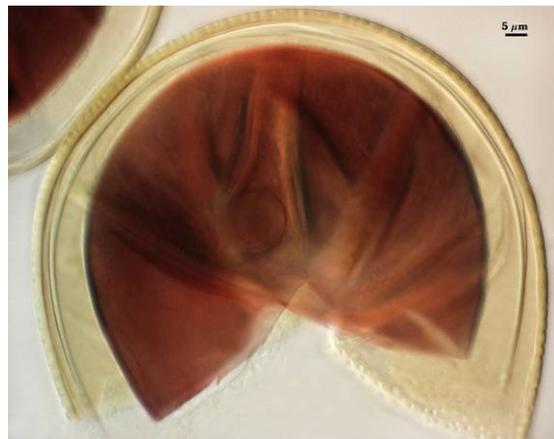


圖 29.孢子壁之組成為菌種型態分類重要依據。

(五) 菌根菌種分子生物鑑定技術

此外利用分子生物鑑定技術，亦為菌根菌種分類方式之一，利用 18S nrRNA 基因片段進行菌種分類，將目前 INVAM 蒐集與交換共 89 個菌株進行生物分子鑑定，而可分別確定為 75 種，依其基因序列比對之相關性，約可分為以下幾個分類單位 1 門 (Glomeromycota)、4 目 (Glomerales、Diversisporales、Archaeosporales、Paraglomerales) 共 8 個科 (Glomeraceae A、Glomeraceae B、Diversisporaceae、Acaulosporaceae、Gigasporaceae、Archaeosporaceae、Geosiphonaceae 及 Paraglomaceae)。

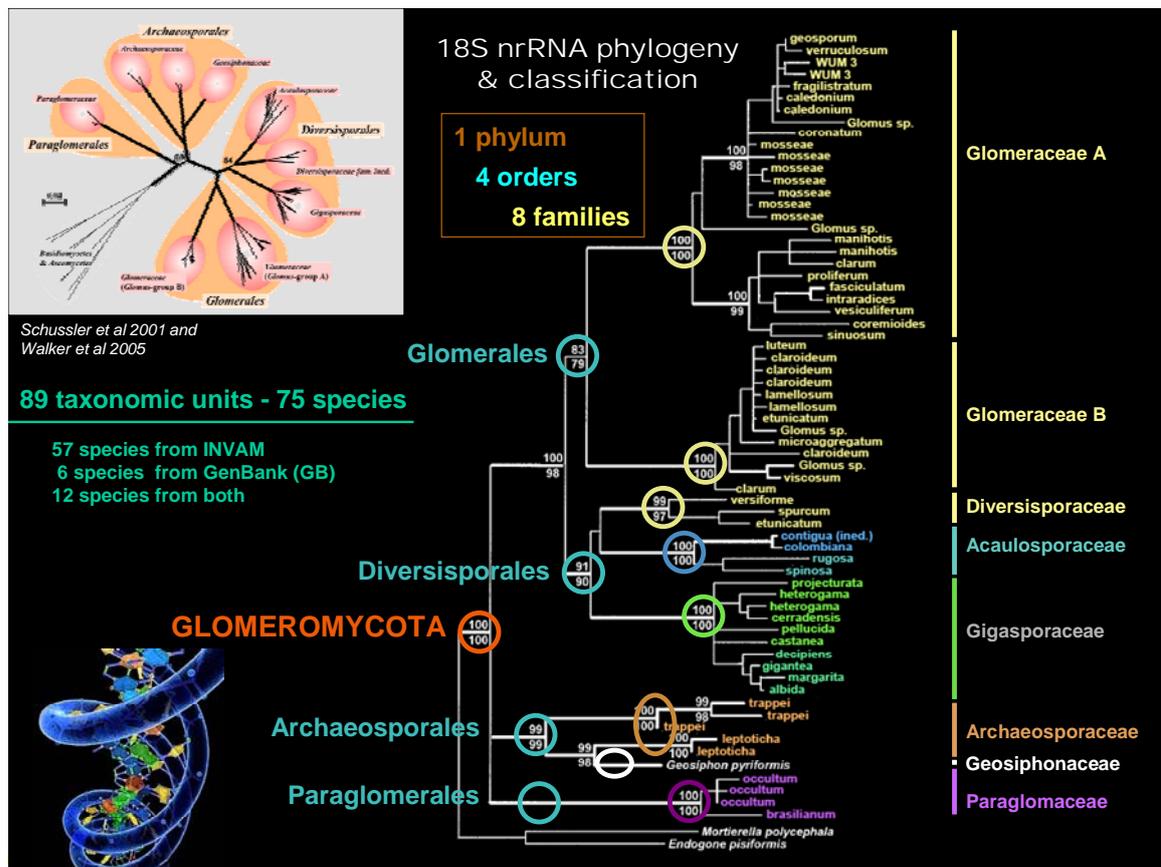


圖30.叢枝菌根菌分子生物鑑定之種間相關圖

此外，由本場分離培養之菌種，經 INVAM 鑑定分別為 *Glomus etunicatum*, *G. intraradices*, *G. spurcum*, *G. mosseae* 及 *Entrophospora Kentinesis*，其中 *G. spurcum* 為世界各地廣泛分布種，但經此次菌種鑑定交流，該中心仍首次蒐集來自台灣之 *G. spurcum* 菌種，研習期間該中心 Dr. Joseph B. Morton 教授，亦表示未來仍非常樂意進行技術上之協助，此將開啟未來國際合作之契機。



圖 31. INVAM 中心具有各個蒐集種源之孢子永久玻片及菌根標本

Joseph W. Jones Ecological Research 介紹

本次研習第二個地點，位於美國東岸地區，喬治亞州 Ichauway 鎮上的 Joseph W. Jones Ecological Research Center，該研究機構，正式成立為 1991 年，屬於可口可樂公司所有，早期此區域為該公司董事會人員狩獵場所，面積約 29,000 英畝林地主要栽種以長葉松(longleaf pine)為主，另外有約 4000 英畝農地，以有機生產方式耕作，目前中心主任為 Dr. Lindsay R. Boring，計有植物、昆蟲、兩棲、哺乳類、森林生態等等，共計 13 個研究室，目前員工約 140 人。該中心與台灣特有生物中心形態類似，均以生態研究與保育為主，但此研究中心以引火方式，去除地表雜木，使林相維持長葉松純林，而火墾過後，再進行林下豆科植物播種，以利固氮作用進行。目前該中心收集與繁殖豆科植物共計 55 種。



圖 31. Joseph W. Jones Ecological Research Center 之轄區面積圖

(一) 田野研習

該中心引火焚燒管理方式，將研究區域以道路劃分為 40 個大區塊，經劃分後道路長度可達 300 英哩，而引火方式，使用地表火方式火墾，經火墾過後，地表之長葉松，雖遭受火燒，但不會因此死亡。而火墾過後，雜木與地表雜草，部分形成灰與生物炭 (biochar)，又有利於土壤養分循環，然而當地土壤多數為砂質土，生物炭回歸於地面，具有土壤改良功用，與減少養分淋洗，並可達到碳吸存之功用。

(二) 外生菌根菌種蒐集

菌根菌依其與宿主植物間之共生所形成不同菌根型態，分為外生菌根 (ectomycorrhiza) 與內生菌根 (endomycorrhiza) 兩大類 (圖 34)，一般而言農作物屬內生菌根居多，但在松科或殼斗科植物中，大多數菌根型態均已外生菌根為主，其中如聞名於世的松露菌，或日本饕客最愛的松茸，就都是屬於外生菌根菌之子實體。而在該研究中心範圍內，最多數之樹種，即為松科植物，因此在該中心研究區域內之林間，常可發現外生菌根之子實體，經研習期間採集到松茸、馬勃類及乳牛肝菌類等外生菌根子實體，但礙於設備及出入境手續問題，未能帶回研究。



圖 32. Joseph W. Jones Ecological Research Center 以道路區隔作為防火線，進行火墾經營管理，而地區母岩富含化石，但土壤多數為砂質土，保肥能力不佳。



圖 33. (左) 測候站架設監控環境因子變化；(右下) 火墾過後生物炭回歸土壤；(右上) Dr. Boring 說明火墾過後生物炭對土壤功能。

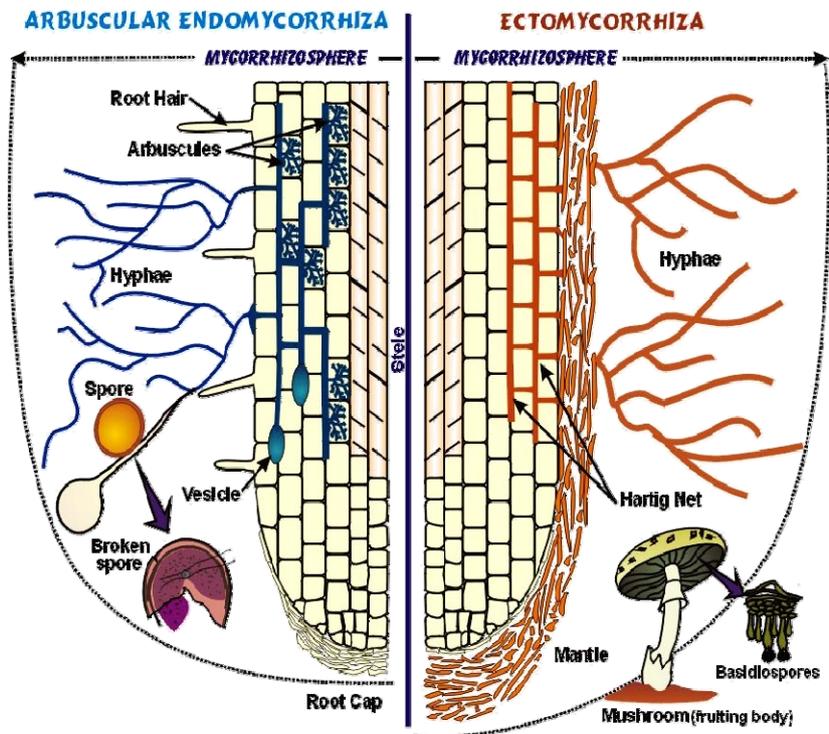


圖 34. 外生菌根及叢枝內生菌根型態圖



圖 35.各種外生菌根菌種子實體

(三) 農業灌溉水資源利用

位於 Joseph W. Jones Ecological Research Center 附近，喬治亞大學農業與環境科學院設有灌溉研究部門「Stripling Irrigation Research Park」，該單位編制 13 人，面積為 130 英畝，主要栽培作物以玉米、棉花、花生、蕃茄及大豆等，其地區土壤為砂質土，對於土壤水管理不易，因此該機構，設立不同灌溉系統進行相關研究，與推廣當地農民應用。



圖 36.Stripling 部門主管 Calvin 介紹水管理感測器與土壤水分分區配置圖



圖 37.Stripling 研究部門利用各種感應元件與無線發報系統，於電腦進行田間管理。



圖 38.利用無線系統進行田間感應元件資料接收。



圖 39.棉花田區埋設滴灌系統進行水分灌溉。



圖 40.自走式灌溉系統解決大面積灌溉問題。



圖 41.利用不同輪作系統（玉米-棉花-花生），確保土壤肥力。

農業灌溉為世界各國對於水資源利用極為重視之一環，由於化學氮肥過度施用，加上淋洗作用，往往造成地下水源污染，因此適當利用輪作制度，進行豆科作物栽培，將能有效減輕土壤及地下水污染情況。該研究部門，即推廣農民利用有效水分控制方式，達到省水及避免環境污染。



圖 42.附近農田施用過多化肥，造成河流嚴重優氧化情形。

佛羅里達熱帶果樹農場研習

佛羅里達為美國熱帶果樹重鎮，其中柑橘產業聞名於世，本次研習實地參訪當地農場經營情形，作為學習借鏡。該地區柑橘產業為其農業主要命脈，因此對於柑橘生產格外重視，農民如需種植柑橘需先進行申請核可後，始可進行果園柑橘種植與生產，此外當地柑橘類果樹販賣需有許可證，始可進行柑橘種苗買賣，因此管制相當嚴格。另外當地熱帶果樹產業與台灣相近，台灣普遍常見之熱帶果樹均應有盡有。且當地非果實蠅疫區，因此木瓜均採露天栽培，此為不同於台灣處。

(一) Homestead 農業生產特區介紹

Homestead 位於邁阿密西南方約 1 小時車程，此區域為農業生產特地區，該地區為佛羅里達農業重鎮，整個區域均為大型農場，該地區土壤屬與壤質砂土其中含有部分較大石灰岩礫，排水相當良好，且酸鹼度偏中性，該地區生產大量盆栽花卉銷售全美，另外亦有台灣農業先進，在當地發展相當有名，如双青園即為

前台灣農技團團長周運豐先生所經營，此外當地種植香蕉、龍眼、芒果、洛梨及木瓜等果園，隨處皆可見大面積栽培。且將當地果樹進行部分產期調節，如部分龍眼於9月期間才正要開花，明顯進行產期調節，此外當地台商，亦從台灣引進熱帶果樹，進行盆苗栽種，再於商展期間進行販售，平均2年生玉荷包荔枝苗，即可販售40~50美元，獲利相當可觀。



圖 43.Homestead 地區土壤排水性好，帶有石灰岩礫之壤質砂土。



圖 44.Homestead 景觀及花卉盆栽生產銷售全美。



圖 45.Homestead 地區熱帶果樹隨處可見。



圖 46.Homestead 地區當地著名之双青園為台商所經營農場。



圖 47.台商於佛羅里達引進台灣熱帶果樹進行盆苗繁殖與販售。

五、心得與建議

本次研習，在菌種濕篩方離方面利用不同濃度之糖液梯度，可將目的菌種孢子、有機物及土壤介質分離更乾淨，而有利於孢子之純化，此外更藉由實際操作與面對面問題之探討，能更清楚菌根菌種屬間之分辨，及菌種型態鑑定，並藉由此次研習機會確立5種本場分離培養之菌根菌種 *Glomus etunicatum*, *G. intraradices*, *G. spurgum*, *G. mosseae* 及 *Entrophospora Kentinesis*，此外針對菌種鑑定部分，INVAM 中心主任答應，如有菌根菌種鑑定問題，可與其聯繫或將菌種寄交，他將樂意進行協助，此外在此中心亦學習到，利用凹玻璃集中菌根菌孢子，將有利於菌種之蒐集及計數，而國內目前在菌根菌鑑定方面，嚴重出現斷層，在未來開發微生物肥料市場上，將是一大瓶頸，建議如能有機會多參加國際間之研習活動，進行知識及經驗交流，將有助於未來產業發展。在水資源利用及耕作系統方面，農業灌溉水分之控管，為世界潮流趨勢，善加利用監測儀器進行田間水分管理，將能有助於人力成本支出，但目前尚須投入更多相關研究，使技術更趨於平民化。

六、附件



圖 47.筆者於 INVAM 中心學習菌種鑑定研習情形。



圖 48.筆者於 Joseph W. Jones Ecological Research Center 研習期間資料蒐集。



圖 49.筆者於 Joseph W. Jones Ecological Research Center 研習期間採集之外生菌根
菌子實體。



圖 50.筆者與各研習單位協助人員合影