

行政院及所屬各機關出國報告
(出國類別：進修)

「抗病基因轉殖火鶴花的評估」

服務機關：行政院農委會農業試驗所
出國人職稱：助理研究員
姓名：莊耿彰
出國地區：美國夏威夷州立大學
出國期間：89年4月10日至90年3月28日
報告日期：90年6月15日

目錄

壹、	摘 要.....	3
貳、	目 的.....	4
參、	進修內容.....	5
肆、	參訪行程.....	24
伍、	參訪心得.....	27
陸、	建 議.....	33
柒、	附 圖.....	34

「抗病基因轉殖火鶴花的評估」出國進修報告

壹、摘要：

夏威夷大學以農桿菌轉殖抗病性基因-(Shiva-1基因)至火鶴花商業生產品種-夏粉(Marian Seefurth)、UH-712及Mauna Kea中並篩選出可能之轉植株進行抗病性評估，經一年之試驗，以6種不同DNA萃取方法比較不同萃取方式對火鶴花DNA產量及品質之影響，結果顯示以CTAB方法萃取之DNA產量最高，其他如Qiagen kit, Promega Wizard kit, Dellaporta及Bio-rad kit萃取出之DNA產量都遠低於CTAB。

以CTAB萃取流程萃取16個不同個體之轉殖基因火鶴花DNA，以經設計之Shiva-1, Npt II 引子進行PCR，結果以MS及UH-712二品種之轉基因植株11株系呈正反應，而Mauna Kea轉植株多呈負反應。

以Dig-Labeling或North2South direct HRP Labeling 非放射性標誌之NPT II核酸探針進行DNA雜交呈正反應之株系DNA結果均為負反應，似乎以CTAB萃取之DNA品質並不足以提供南方雜交(Southern Hybridization)所需。

經萃取RNA 進行RT-PCR結果顯示所取之樣品 (MS-1~6) 均呈現NPT II 基因之特定條帶。

田間接種細菌性葉枯病病原菌 (Xcd) 於Marian Seefurth及UH-712的基因轉植株，結果顯示轉植株與非轉植株間並無顯著差異，也未發現延遲發病之趨勢，可能是基因的表現或轉植株分泌之Shiva-1濃度不足以顯示抗病性，為此部份之調查仍持續進行中，實際之耐抗病性仍待證實。

貳、目的：

火鶴花是本省具高產值的新興花卉之一，栽培品種主要來自於荷蘭的種苗公司，由於地區環境的差異，這些品種在本省生產時因季節差異，切花品質極不穩定，且切花生產期集中於春夏之際，造成價格的滑落，而在需求較大的秋冬季節，反需由國外進口應急。

近年來火鶴花生產受到細菌性葉枯病的嚴重為害，火鶴花生產力急速下降，栽培農戶收益入不敷出面臨廢耕的壓力，因此有必要從品種選擇，栽培管理等來增加火鶴花的抗病能力，但最佳途徑仍為透過雜交育種，把較耐病的種原導入栽培種中，選育適合切花或盆花用之耐抗病品種，可有效減輕農民因葉枯病造成之損失。

1980 年代夏威夷地區也曾發生嚴重的細菌性葉枯病，短期間內摧毀了近 50% 的產業，經由業者與政府單位的努力，疫情在 1994 年經由田間衛生管理的改善，有效的被控制下來。此一時期業界與研究單位也同時感受到耐抗病品種的重要性，並開始嘗試以傳統育種與基因轉殖之方式開發耐抗病的品種。

為期經由育種或栽培模式之改變，有效的控制本省細菌性葉枯病之蔓延，本研習計畫希望經由研究人員至夏威夷大學花卉研究室沿襲火鶴花之傳統育種、栽培體系與基因轉殖株之抗病篩選技術，期能對本省火鶴花產業提供解決方案。

參、進修內容：

一、前言：

全球的火鶴花生產地區包括有荷蘭(69公頃)，模里西斯(50公頃)，夏威夷(99公頃)及加勒比海地區，其中加勒比海地區的產量擴展在近幾年相當的快，其中千里達在1994年輸往美國的火鶴花即達6千萬枝，其生產面積可能在22公頃以上，牙買加則有25公頃，多明尼加共和國的栽培面積則在5-20公頃之間，至於美國本土切花用火鶴花的供應地區仍以夏威夷為主(1995年 430萬枝)。夏威夷的火鶴花生產約占全球生產的20%，1999年夏威夷火鶴花銷售1550萬枝的火鶴花，產值約1068萬美元(f.o.b.)。

夏威夷大學的火鶴花育種計畫自1965年由Dr. Kamemoto開始進行，1990年Dr. Kamemoto退休後，由Dr. Kuehnle 接手後續之研究工作。目前已收集豐富的種原供育種使用，育種目標著重於：(1)花色。(2)花大小。(3)花型。(4)葉形。(5)香味。(6)切花與盆花等優良單株之選育。

在過去的30年間已命名推廣37個品種供業界選擇，其中不乏許多優良的品種，如高產的Marian Seefurth, Alii, Tropic Ice, 雙色品種如Anuenue, Mauna Kea, Tropic Ice, 對細菌性葉枯病耐性較強的Kalapana, 新花色如紫色的ARCS, ARCS Hawaii, 及Lavendr Lady, 新花型的”Misty Pink, Pink Chamgagne, 及盆、切花兩用的品種Pink Elf, Tropic Ice, ARCS等，今年初(2001)則推出”White Lady”及”Tropic Sunrise”，育種成效相當豐富。

火鶴花育種計畫在大學部份以基礎研究為主，包括遺傳學、細胞遺傳、解剖、植物發育、病害檢定及線虫抗耐性之篩選研究上。雜交選拔的初選單株，於夏威夷大學實驗室以生長點培養增殖至一定數量後送至位於大島Hilo的夏威夷大學試驗站馴化培育成小苗後，在送至合作之火鶴花栽培業者試種、協助性狀及產量調查。再依調查的結果評選命名。其中Waiakea實驗站自夏威夷大學承接初選之優良品系後於該實驗站進行性狀、產量的初評，並增殖複選之優良植株供生產火鶴花的農場進行較大面積的生產，以評估商業生產之可行性，並將其評估結果送回夏威夷大學作為品種命名的資料。

在火鶴花育種的後裔選拔上，夏威夷大學結合了產業的需求，將育種者的知識、規畫能力與對未來的展望與學者充份的溝通，並隨著時空的轉移，略作調整，主要目標在改善切花產量，瓶插壽命及切花品質，其

基本的是選拔方向包括有：

苞片顏色穩定，光澤明亮，苞片形態近於心臟型，平展且苞片基部接近或略為重疊者為佳，至於苞片與花柄角度是上揚或下垂，則因消費者需求及包裝航運的特殊需要而異，花序長度則必需與苞片大小呈均衡的感覺，花梗需要具有直、長且不易折損的特性。

在夏威夷火鶴花其理想切花數因不同花型的品種而異，以標準型品種而言，每年每株有 5-6 支的切花，即為業者所能接受；節間則愈短愈好，因為節間短可以延長更新的年限，而由於在夏威夷高人工成本的考量下，除葉處理通常不被建議，因此葉片也不宜太大。

病害方面早期著重於炭病 Anthracnose 耐抗性的篩檢，但自 1987 年夏威夷的火鶴花產業受細菌性葉枯病嚴重摧毀後，對細菌性葉枯病的耐抗病性檢定及篩選，成了育種計畫中相當重要的一環。

穿孔線虫是夏威夷火鶴花產業的另一個重要害虫，嚴重影響植株的生育，因此篩選耐、抗穿孔線虫的品種也是當地育種工作的另一個重點。目前夏威夷大學利用試管培養的植株，接種穿孔線虫後，植株的生育反應已建立耐抗線虫的篩選指標，目前已利用此一方式篩選 17 個品種。

市場消費趨勢，對一些具有香味的品種相當有興致，尤其是一些具有香氣的盆花品種，如 Lady Beth, Leilani, A×amni-oquiense (UH724, UH727), A×antro-oquiense (UH729)，但目前的切花品種仍然沒有具香氣的品種出現。

在抗病育種上：目前切花之主要種原 *Anthurium andraeanum* 都屬於感病品種，而其它如 *A. amnicola*, *A. antioquiense* 等雜交產生之盆花品種均較為耐病，因此如能利用這些耐熱種原與切花品種進行種間雜交及胚培養，產生種間雜交種，或可選育耐抗病之切花品種。

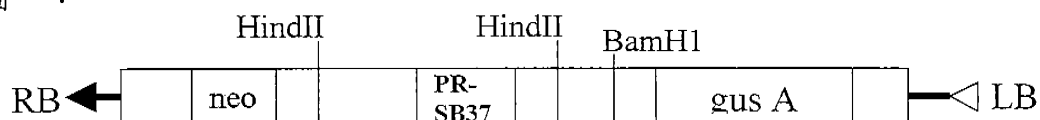
另一個解決方案是以基因轉殖的方式，直接將耐抗病基因轉殖入主要的商業品種上。唯基因之取得與轉殖技術、轉植株之篩選、轉植株之抗病性表現均待建立評估。

早期的調查指出天南星科作物只有海芋及電信蘭利用 B6 農桿菌接種成功，1991 年夏威夷大學的 Dr. Kuehnle 成功的以 *A. tumefaciens* strain A281 及 C58 將外源 DNA 轉殖入火鶴花，開始火鶴花的基因轉殖工作。

二、研習內容：

夏威夷大學花卉研究室以構築的 Shiva-1 基因、neo(標示基因) 及 CaMV 35S 啟動子(如圖一)插入 pBI121 的 HindIII 切位間,構築出 pBRB37 質體,並將此一質體導入 LBA4404 農桿菌內。將“Marien-Seefurth”、“Mauna Kea”及“UH-712”組培苗之節間部份浸在含目標基因的 LBA4404 農桿菌溶液中數分鐘後,與源自煙草的“Su”輔助細胞培養於 Su 培養基五天後,移入含不同抗生素之 Cmod 培養基篩選可能之轉殖個體,並將選得之個體個別增殖,以作為進一步篩選之材料

圖一：



1. 不同萃取方法對火鶴花 DNA 產量及品質之影響：

長期以來在分子生物領域中,以火鶴花為材料之相關研究一直相當缺乏,其主要原因是受限於火鶴花之 DNA 萃取技術,為取得高品質及高產的火鶴花 DNA 首先進行以不同萃取方式萃取火鶴花 DNA 之比較試驗。本試驗採取 MS 及 UH712 之組織培養苗幼葉為材料,分別秤取 100mg 幼葉後以 CTAB protocol, Dallapota protocol 及 Qiagen Dneasy kit, Promega Wizard kit、Amercham Phyto-Pure kit、Bio-rad kit 萃取 DNA 並比較其 DNA 產量與品質,以決定利用何種萃取方式進行後續之試驗。

本試驗採取栽培於夏威夷大學溫室中的“Marien-Seefurth”-6、

及"UH-712"-11 基因轉殖株剛開展的幼葉為材料，分別秤取 100mg 的幼葉，於研鉢加入液態氮磨碎葉片組織後，依個別萃取流程操作，萃取 DNA。

CTAB 操作流程：

加入 1 ml 的 DNA 萃取緩衝液 (2%(w/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM EDTA ; 1.4 M NaCl ; 1.0%polyvinyl polyprolidone; 1.0%(v/v) β -mercaptoethanol), 再放入 60°C 水浴 30 分鐘，輕輕混勻後加入 500 μ l chloroform-isomamyl alcohol (24 : 1, v/v) , 混合均勻，在 4°C 以 14,000rpm 離心 10 分鐘 (處理 2、3 分別於此時取上清液加入 chloroform-isomamyl alcohol 或 Promega Wizard kit 的 Rinse 混合均勻，於 4°C 以 14,000rpm 離心 10 分鐘)。取上清液加入 500 μ l 之冰冷 isopropanol，混合均勻後放置在室溫下沉澱 1~2 小時(或 -20°C，隔夜)。再離心去上清液，再加入 1 ml 之 washing buffer (76% ethanol (v/v); 10 mM ammonium acetate) 輕輕混勻後，再於 4°C 下以 14,000 rpm 離心 10 分鐘，再去上清液將沉澱的 DNA 置於無菌操作台內吹乾。將凍乾之 DNA 沉澱溶於 50 μ l 的無菌水，再加入 RNase (10 μ g/ml) 在 37°C 下反應 20 分鐘。

Dellaporta 操作流程：

加入 500 ml 的 DNA 萃取緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 50 mM EDTA, pH 8.0 ; 500 mM NaCl), 加入 1/10 體積的 20% SDS，混合均勻，放入 60°C 水浴 30 分鐘，並偶爾搖動混合。

30 分鐘後取出加入 1/3 體積 5M 的醋酸鉀，輕微的倒轉試管混合，

置於冰桶 (4°C) 內 20 分鐘。在 4°C 以 14,000rpm 離心 20 分鐘。取上清液經由濾紙加入裝有 800 μ l 冰冷 ethanol 試管內，置於 4°C 1 小時。於 4°C 以 13,000rpm 離心 15 分鐘。去除上清液後將沉澱物置於無菌操作台內吹乾。加入含 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 及 10 mM EDTA, pH 8.0 的溶液溶解沉澱物，加入 RNase (20 μ g/ml) 在 37°C 下反應 20 分鐘。再加入 500 μ l 的 phenyl/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)。離心 2 分鐘後取上清液加入 0.4 體積的 5M NaCl 和 2.5 體積預冷的 ethanol，置於 -20°C 沈澱一晚。第二天於 4°C 下以 14,000 rpm 離心 30 分鐘，去除上清液後略微風乾 DNA 沉澱物，加入 50 μ l 無菌水溶解 DNA。

至於 Qiagen Dneasy kit、Promega Wizard kit、Amercham Phyto-Pure kit、Bio-rad kit 的 DNA 萃取流程，請參考各該公司之操作手冊。

萃取之 DNA 以 Shimadzu UV 160U 測定 OD 280nm、260 nm、230nm 之讀值，及計算 DNA 含量濃度及品質，並以未稀釋之 Genomic DNA 於 1 倍的 TAE 溶液中以 2.0% agarose 膠片進行電泳後，以 ethidium bromide 浸染後於紫外燈下觀察。

為進一步比較不同萃取流程萃取得之 DNA 品質，利用萃取得之 DNA 進行聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)。

ISSR reactions 每 25 μ l 反應溶液中含有 100ng 的 DNA 樣品及 0.5 μ l 的 10 μ M dNTP (sigma), 0.2 μ M UBC818 primer (5'-CAC ACA CAC ACA CAC AG -3'), 1.25 μ l 的 1U Tag DNA polymerase (Promega) 及 5 μ l of 的 10X REDTaq PCR Buffer。反應條件為 94°C 3 分鐘, 55°C 1 分鐘, 72°C 1

分鐘後，樣品在 94°C 3 分鐘，55°C 1 分鐘，72°C 1min 分鐘下 43 個循環，最後於 72°C 5 分鐘。整個過程於 iCycler (BIO-RAD) thermal cycler 進行。

PCR 產物在 1 倍的 TAE 溶液中以 1.2% agarose 膠片進行電泳 並以 ethidium bromide 浸染後於紫外燈下觀察增殖的反應條帶。

結果：

不同DNA粹取流程萃取出之DNA經測定後其OD 280nm、260 nm、230nm 之讀值並經換算DNA產量後結果如表一。由結果顯示CTAB萃取流程所萃取得之DNA產量遠高於其他萃取流程，且OD260/280比值也高於1.8(DNA品質指標)。

ISSR結果顯示：經由不同萃取流程萃取得之DNA顯現之條帶相似性極高，但明亮度有顯著的差異，顯示個別萃取DNA之完整性仍有差異。

表一：不同 DNA 粹取流程萃取出之 DNA 品質與產量比較

MS-6	100mg						Total
				ug/ul			Yield
	OD 280	OD 260	OD 230	OD 260/280	OD 260/230	DNA yield	ug/100mg
CTAB	0.054	0.11	0.118	2.0370	0.9322	1.1	55
CTAB + CHLOROFORM	0.051	0.098	0.112	1.9216	0.8750	0.98	49
CTAB+RINSE	0.058	0.115	0.128	1.9828	0.8984	1.15	57.5
Dellaporta	0.027	0.048	0.048	1.7778	1.0000	0.48	24
Qiagen	0.002	0.002	0.009	1.0000	0.2222	0.02	2
Wizard	0.017	0.027	0.027	1.5882	1.0000	0.27	13.5
Pure	0.002	0.001	0.027	0.5000	0.0370	0.01	0.5
Bio-rad	0.016	0.025	0.026	1.5625	0.9615	0.25	12.5
712-11							
CTAB1	0.025	0.052	0.083	2.0800	0.6265	0.52	26
CTAB2	0.033	0.064	0.089	1.9394	0.7191	0.64	32
CTAB3	0.043	0.074	0.159	1.7209	0.4654	0.74	37
Qiagen	0.006	0.003	0.009	0.5000	0.3333	0.03	3
Wizard	0.034	0.05	0.064	1.4706	0.7813	0.5	25
Pure	0.004	0.005	0.008	1.2500	0.6250	0.05	2.5
Bio-rad	0.031	0.05	0.043	1.6129	1.1628	0.5	25
Dellopta	0.009	0.014	0.014	1.5556	1.0000	0.14	7

2. 以 PCR 進行火鶴花基因轉殖株之篩選與評估：

夏威夷大學的基因轉殖計畫已成功的以選擇性培養基篩選出數十個可疑的轉殖個體，並以 ELISA 進行初步的鑑定工作。為進一步確認這些轉植株是否具有目標基因片段，本部份試驗利用 NPT II 及 Shiva-1 特定引子，篩選具有此特定片段之樣品。

植物材料：本試驗採取栽培於夏威夷大學溫室中及組織培養“Marian-Seefurth”、“Mauna Kea”及“UH-712”初步篩選得基因轉殖株幼葉為材料，以 CTAB 萃取流程萃取 DNA，並已經設計之特定引子，針對特定基因片段進行增殖，以確認具特定片段之轉殖植株。

Specific PCR 使用 SHI-RIGHT 引子‘5’-ATT CTC AAC CAA CTG CGC GG-3’及 SPR-LEFT 引子‘5’-TGC CAT CCT TCT TTC TCG TG-3’或 NPT II 引子 A 5’-CCC CTC GGT ATC CAA TTA-3’與引子 B 5’-CGG GGG GTG GGC GAA GAA CTC CAG-3’。PCR 反應體積為 25 μ l。其中包括 1.25 μ l 的 RedTaq DNA polymerase (Sigma), SHI-RIGHT 及 SPR-LEFT (或 NPT II) 引子各 10 mM, 0.5 μ l 的 10 μ M Deoxynucleotide Mix (Sigma), 2.5 μ l 的 10X REDTaq PCR Buffer reaction buffer (Sigma) and 100 ng 的 DNA 樣品。反應條件為 94°C 3 分鐘，然後在 94°C 1 分鐘，58°C (Shiva-1, 或 NPT II 61°C) 1 分鐘，72°C 2min 分鐘下 29 個循環，最後於 72°C 9 分鐘。

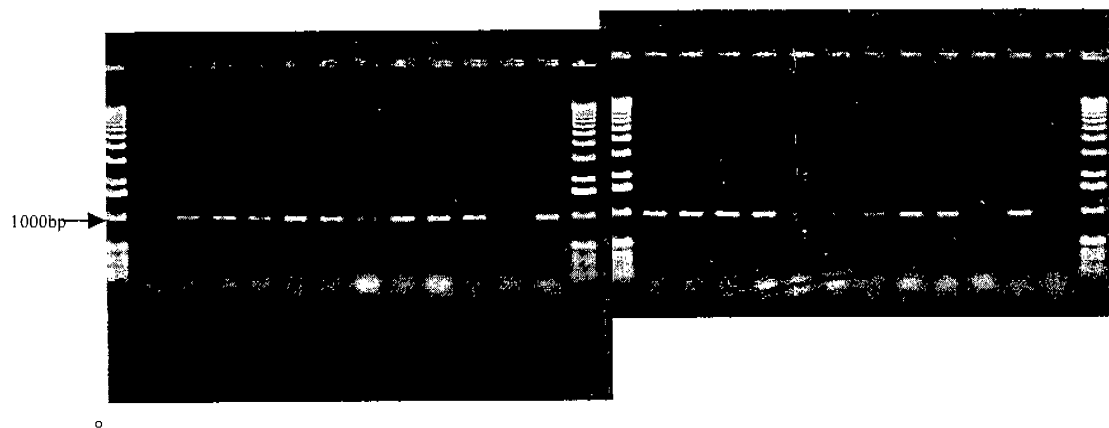
PCR 產物在 1 倍的 TAE 溶液中以 1.2% agarose 膠片進行電泳 並以 ethidium bromide 浸染後於紫外燈下觀察增殖的反應條帶。整個過程於 iCycler (BIO-RAD) thermal cycler 進行。以 Shiva-1 引子進行 PCR 的目標片段大小為 730 bp；以 NPT II 引子進行 PCR 的目標片段大小為 1049 bp。

ELISA 檢定採用 Agdia 公司的 NPT II ELISA kit。樣品採自威夷大學溫室的植株幼葉，分別秤 100mg 後，於研鉢中加入液態氮磨碎組織後，依循操作手冊萃取汁液加入含反應血清之容器中，由其顏

色反應判定該組織液中是否含有 neomycin phosphotransferase II.

結果：

夏威夷大學初步篩選的株系中，編號 MS-1~6 及 UH-716-1、3、4、8、9、11、13、15、16 等 15 個株系來自組培苗或溫室的樣品其 NPT II、Shiva-a 或 ELISA 檢定均呈正反應（MS-3 缺溫室的樣品），而來自溫室的 Mauna Kea 樣品 MK-3、5、6 之 NPT II 呈正反應，MK-4、5、6、9 之 ELISA 檢定呈正反應，但來自組培苗的樣品，除 MK-6 的 NPT II PCR 呈正反應外，其餘樣品之 Shiva-1、NPT II PCR 結果均呈負反應。（圖及表二）



說明：以 NPT II 引子進行 PCR 之結果。由左至右分別為 Promega 1kb extend marker, UH-712, UH-712-1、3、4、8、9、11、13、15、16, MS, MS-1、2、4、5、6; MK, MK1-1、3, MK2-5、6、9 及對照（純水）。目標片段大小為 1049bp。

表二：基因轉殖株之 PCR 與 ELISA 檢定結果表

PCR(樣品來自溫室)		品(株)系	PCR(樣品來自組培苗)			ELISA
NPT II	Shiva 1		NEO	NPT II	Shiva 1	
-	-	UH 712 control	-	-	-	
+	+	UH712 1-1	+	+	+	+
+	+	UH712 1-3	+	+	+	+
+	+	UH712 1-4	+	+	+	+
+	+	UH712 1-8	+	+	+	+
+	+	UH712 1-9	+	+	+	+
+	+	UH712 1-11	+	+	+	+
+	+	UH712 1-13	+	+	+	+
+	+	UH712 1-15	+	+	+	+
+	+	UH712 1-16	+	+	+	+
-	-	MS control	-	-	-	
+	+	MS 1-1	+	+	+	+
+	+	MS 1-2	+	+	+	+
+	+	MS 1-3				+
+	+	MS 1-4	+	+	+	+
+	+	MS 1-5	+	+	+	+
+	+	MS 1-6	+	+	+	+
-	-	MK Control	-	-	-	
		MK 1-1	-	-	-	
-	-	MK 1-2				
-	-	MK 1-3	+	+	+	-
-	-	MK 1-4				-
		MK 2-5	+	+	-	+
+	-	MK 2-6	+	+	-	+
-	-	MK 2-9	-	+	-	+

3. 火鶴花基因轉殖株之 DNA 雜交：

以 CTBA 萃取之 DNA 以 Hind III 限切酶於 37°C 下將 DNA 分解後，於 1.2% agarose 膠片，1X TAE 溶液中，以 37V 電壓電泳，於紫外燈下觀察 DNA 分解情形並照相後，膠片經以 0.2N HCl 清洗後再經 Denature 及中性化後，以南方轉漬法將 DNA 轉印在轉漬薄膜上，以紫外線處理讓 DNA 結合在膜上。

DNA 核酸探針的準備：萃取自質體 426（含 neo 與 Shiva-1 基因）的 DNA 以 NPT II 引子進行 PCR 後，於 1.2% 膠片電泳切下目標條帶（1049 bp）後以 GeneClean kit 純化，再以 Dig-DNA Labeling kit（或 South2North kit）. 製作非放射性核酸探針。

以 CTAB 萃取 UH-712-1、8、9、11、15 之 DNA 樣品以質體 426 為對照，經雜交後除對照樣品出現雜交條帶外，其他樣品均未出現預期之雜交條帶。

4. 火鶴花基因轉殖株的 RNA 萃取及 RT-PCR：

為確認轉殖基因於轉殖植株內之基因現表，嘗試自火鶴花葉片萃取 RNA，以進行 RT-PCR 確認該基因片段是否存在 m-RNA 內。由於目標基因於構築時是以 CMV35S 為啟動子，理論上該基因如成功的轉殖至該植株，該基因於任何生長時期均應有所作用，以其 RT 產物進行 PCR 應可增殖出特定基因片段。

火鶴花 RNA 之萃取流程：

- A、 加入 15ml 的萃取液 (80ml Tris-HCl, 150 mM LiCl、5mM EDTA、5%SDS) 至離心管內，再加入 0.45g 的 PVPP 及 450ml 的 2 β -mercaptoethanol，混合均勻。
- B、 於研鉢內以液態氮磨碎 0.5g 的火鶴花幼葉樣品，加入含萃取液的離心管內，以人工劇烈搖動混合。
- C、 於室溫下以 12000rpm 離心 20 分鐘，吸取上清液至新的離心管。
- D、 加入等體積的 chloroform，搖動混合。於室溫下再離心 20 分鐘。並重複兩次。
- E、 吸取上清液至新離心管，加入等體積之 PCL，搖動混合。於室溫下再離心 20 分鐘。
- F、 吸取上清液至新離心管，加入等體積之 isopropanol alcohol 與 1/10 體積的 3M NaOAc，混合後置於 -20°C 下過夜。
- G、 於 4°C 下以 14000rpm 離心 30 分鐘，移除上清液，並以 70% 酒精清洗沈澱物兩次。
- H、 沈澱物略微乾燥後加入 DEPC 處理過之去離子水溶解，並加入適量的 LiCl 使其最終濃度達 2M。
- I、 溫和的搖動後，置於 4°C 下過夜，等待 RNA 沈澱。
- J、 於 4°C 下以 14000rpm 離心 30 分鐘，移除上清液，並以 70% 酒精清洗沈澱物兩次，於無菌操作台內讓沈澱物乾燥。
- K、 以 DEPC 處理之去離子水將沈澱物溶解。並測定濃度。
- 採取“Marien-Seefurth”及“UH-712”轉殖株之幼葉抽取 RNA 並測

定濃度後其結果如表二。結果顯示此一萃取流程可有效取得火鶴花之 RNA。RNA 儲存於-80°C 凍箱中以備進行逆轉錄(Reverse transcription)。

以萃取之 total RNA 10ul 加入 2ul 的 25uM oligo dT₍₁₅₎ 混合後於 65°C 下 10 分鐘，讓 RNA 變性後，急速於冰桶內快速冷卻。於離心管分別加入 25mM MgCl₂、10 倍的 PCR buffer、10mM dNTP、20uRNase Inhibitor、100u Reverse Transcriptase 混合後加入變性之 RNA。

將離心管置於室溫下 10 分鐘後，將溫度升至 42°C 30 分鐘，99°C 5 分鐘，而後快速降至 4°C，完成逆轉錄的過程。

RT-PCR 於 RT 產物加入 25mM MgCl₂、10X PCR buffer、各 20uM 的 NPT II-R、L 引子及 2.5u Taq Polymerase 並加去離子水至 80ul。反應條件為 94°C 3 分鐘，然後在 94°C 1 分鐘，61°C 1 分鐘，72°C 2min 分鐘下 32 個循環，最後於 72°C 9 分鐘。

PCR 產物在 1 倍的 TAE 溶液中以 1.2% agarose 膠片進行電泳 並以 ethidium bromide 浸染後於紫外燈下觀察增殖的反應條帶。整個過程於 iCycler (BIO-RAD) thermal cycler 進行。

結果顯示所採樣品-MS-1、2、3、6 與對照之質體 426 均顯現 1049 bp 之目標條帶。

表三：火鶴花 RNA 萃取濃度表

Transgenic plant from green house						ug/ul
	OD 280	OD 260	OD 230	OD 260/280	OD 260/230	RNA yield
MS-1	0.154	0.272	0.22	1.7662	1.2364	2.176
MS-2	0.087	0.137	0.121	1.5747	1.1322	1.096
MS-3	0.069	0.107	0.093	1.5507	1.1505	0.856
MS-6	0.026	0.045	0.029	1.7308	1.5517	0.36
712-1	0.05	0.087	0.064	1.7400	1.3594	0.696
712-4	0.076	0.13	0.088	1.7105	1.4773	1.04
712-8	0.047	0.077	0.066	1.6383	1.1667	0.616
712-9	0.073	0.112	0.08	1.5342	1.4000	0.896
712-11	0.036	0.061	0.049	1.6944	1.2449	0.244
712-13	0.104	0.165	0.096	1.5865	1.7188	1.32
712-15	0.081	0.127	0.103	1.5679	1.2330	1.016
712-16	0.13	0.214	0.169	1.6462	1.2663	1.712

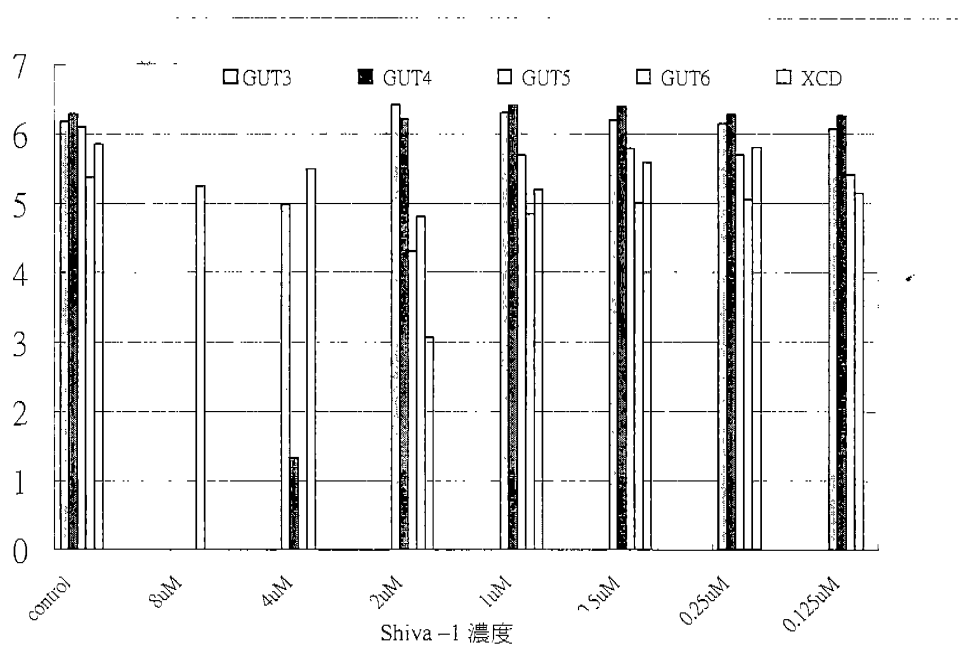
5. 火鶴花基因轉植株之病原菌接種與田間評估：

5-1、由於藥劑防治對細菌性葉枯病並無顯著之效果，夏威夷大學植病系為有效檢測細菌性葉枯病，以含有螢光基因的菌株(V108LRUH1 of *X. campestris* pv. *dieffenbachiae*)檢測植株受感染的情形，評估不同品系的耐抗病性。為開發有益農業菌在病害防治上的用途，植病系的 Dr. A. M. Alvarez 自火鶴花的泌液中分離出了 GUT3、GUT4、GUT5 及 Gut6，而後緒的試驗結果顯示這些分離自泌液的細菌對細菌葉枯病病原菌都有相對程度的競爭性，適度的混合使用明顯的抑制葉枯病病原菌菌株的數量。為進一步瞭解 Shiva-1 peptide、對有益農業細菌與細菌性葉枯病病原菌生長的影响，本試驗的第一部份使用含有螢光基因的 Xcd 菌株-V108LRUH1、GUT3、4、5、6 與不同濃度之 Shiva-1 peptide 培養，比較 Shiva-1 對不同菌株生育之影响。

Xcd 菌株-V108LUX 於 28°C 培養於含 50ug/ml Rifampicin，10ug/ml

Tetracycline 及 100ug/ml Cycloheximide 的 peptone-glucose 培養基(1% peptone, 0.5% glucose 及 1.7% 洋菜)兩天後，取適量的菌泥以無菌水中稀釋為 10^6 cfu 備用。其他有益農業菌也分別培養於含適當抗生素的 peptone-glucose 培養基兩天後，以無菌水中稀釋為 10^6 cfu。Shiva-1 peptide 以 Phosphate buffer(1M Na_2HPO_4 、1M NaH_2PO_4) 溶解，濃度調整為 8M、4M、2M、1M、0.5M 及 0.25M 後，分別加入 10^6 cfu 的 Xcd, GUT3、4、5、6，於 30°C、220rpm 下培養 1 天後，分別稀釋至 10^4 、 10^3 、 10^2 、10cfu，吸取 100ml 培養於 Nutrient Broth 培養基、27°C 下一天，別計算菌株數，比較不同 Shiva-1 濃度對不同細菌生長之影響。

調查所得數據經轉換為 log 函數後，結果如下圖：



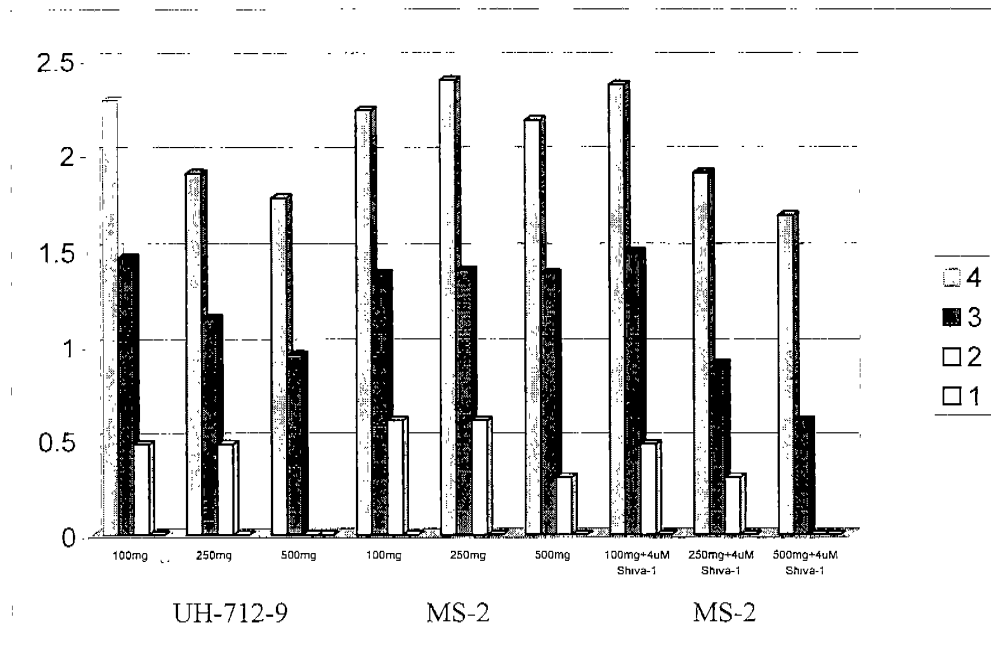
5-2、田間接種調查：為進一步比較不同株系耐抗病性的差異，本試驗以含生物性螢光基因的葉枯病菌株-V108LRUH1，接種於不同株系的基因轉植株，並調查其發病情形。

植物材料採取栽培於夏威夷大學溫室中的“Marien-Seefurth”及”UH-712”基因轉植株為材料，計有 MS-1、MS-2、MS-3、MS-4、MS-5、MS-6 及 UH712-1、UH712-3、UH712-4、UH712-8、UH712-9、UH712-11、UH712-13、UH712-15、UH712-16 等 15 個選系並以“Marien-Seefurth”及”UH-712”為對照。選取高約一英尺高，帶四-五片葉之植株，於 2000 年 12 月接種帶有螢光基因之 Xcd(將植株至於塑膠袋內以 10^6 cfu Xcd 溶液噴濕，封口後置於室溫下 24 小時取出，置於安 80%遮光之玻璃溫室內，自第四週起每週調查葉片罹病情形，並於暗室內以感光底片置於葉片下方曝光八小時，調查 Xcd 感染情形。

本部份之調查於 2000 年 12 月開始進行，至 3 月底，第十二週之調查結果，基因轉植株與對照植株間仍未見明顯之差異性，目前仍由夏威夷大學花卉研究室持續調查中。

為進一步瞭解基因轉殖植株內分泌 Shiva-1 蛋白質濃度之差異，初步以 UH-712-9 及 MS-2 的幼葉組織為材料，分別秤取 100mg、200mg、500mg 的葉片組織，於研鉢內加入 100ul 的 Phosphate buffer 磨碎，於室溫下以 8000rpm 離心 2 分鐘，吸取 50ul 上清液加入 50ul 濃度為 10^6 cfu 的 Xcd，MS-2 另增 4uM Shiva-1 處理，以比較植株內生 Shiva-1 的濃度。

由初步結果顯示 UH-712-9 萃取液對 Xcd 生長的抑制強於 MS-2，而不同比例的 MS-2 萃取液加上 4uM shiva-1 則顯示高濃度萃取液對 Xcd 生長的抑制強於低濃度。



討論：

不論以何種萃取流程萃取之 Genomic DNA 在電泳後看起來均有部份暈散的現象，而由表一的結果顯示：在 CTAB 萃取流程中，以 chloroform 處理兩次或以 Wizard kit 的 Rinse 處理並沒有明顯提高 DNA 品質的作用。部份學者認為測定 DNA 濃度時受到萃取樣品內的一些代謝產物或 CTAB 的影響，濃度會有被高估的情形，但在本操

作過程中以 CTAB 萃取之 DNA，不論以 SSR、specific PCR 或以限切酶處理結果均顯示，DNA 的產量並沒有高估的情形。

理論上利用過濾純化的方式是一種簡單又省時的 DNA 萃取方法，如 Qiagen Dneasy kit；另一個選擇過濾純化的理由是可以避免使用一些有毒的藥劑如 Phenol 等，但經由過濾純化過程萃取得的 DNA 濃度都偏低，額外的以酒精沈澱濃縮 DNA 濃度至合適範圍成了必須的工作。此外在價格上過濾純化 DNA 的商業模組價格還高於傳統的萃取方式，就大量萃取樣品時也是需考量的因素。(表四)

對火鶴花而言 CTAB protocol 是一種簡單且便宜的 DNA 萃取方法，所萃取之 DNA 可適用於 RAPD 或 ISSR 及其他 PCR 分析之用，但並不適合做為南方雜交之用。

表四：不同 DNA 萃取方法成本及產量比較

萃取方法	操作所需時間	價格	DNA 產量	DNA 品質
Qiagen	2 hrs	High	Low	Good
Wizard	2 hrs	Medium	Medium	Good -Medium
CTAB	3 hrs	Low	High	Medium

細菌性葉枯病幾乎摧毀了夏威夷的火鶴花產業，如何發展一個具抗病基因的品種了產業最大的期待。理論上直接將基因轉殖入商業品種內，可以直接獲得具抗病性的品種，並同時保有該品種的產量及品種特性。基於此一立論，夏威夷大學成功的以農桿菌法將 Shiva-1 基因轉殖至“Marian-Seefurth”及”UH-712”(Tropic flame)的組培個體上，並且利用 ELISA 初步篩選出可能之轉殖個體。就整個轉基因作物的篩選評估上：經選擇性培養基篩選出之可疑組織，經組織培養繁殖後，利用

ELISA檢定NPT II蛋白，並萃取DNA以該目標基因或標示基因之特定引子（於本火鶴花轉基因案例中分別為shiva-1及NEO），進行特定引子PCR；將這些確認含目標基因的植株馴化、種植於溫室中，以含生物性螢光之細菌性病原菌接種後，可以比較其耐抗病性。

同時以萃取之DNA以特定之限制酶處理後，以特定片段之DNA（如shiva-1或NPT II DNA片段）為探針，可以檢測出該樣品DNA內含有多少該特定基因片段。

為了解轉殖入植株內的DNA是否有所作用，萃取火鶴花RNA，進行逆轉錄，製造第一股cDNA，用以進行特定引子PCR（如 shiva-1引子），可以確認該基因是否有作用；唯目前RT-PCR結果與田間接種試驗比較結果顯示轉殖的基因所分泌的特定蛋白量濃度仍不足以呈現明顯抗病性，基因轉殖的實質效益仍待評估。

肆、參訪行程：

日次	日期	地點	活動內容
第一天	二月一日 星期四	檀香山-希洛 (Hilo)	下午抵達夏威夷島 Hilo 機場。 拜訪夏威夷大學希洛(Hilo)分校院長 Dr. Fujii.
第二天	二月二日 星期五	希洛(Hilo)	上午參加 USDA Hilo 推廣中心 舉辦之火鶴花栽培課程 下午拜會 Waiakea 試驗站 參觀台灣移民至夏威夷投資的 David Chang 經營之蘭園(Mt. View Orchid)。
第三天	二月三日 星期六	希洛(Hilo)	例假日
第四天	二月四日 星期日	希洛(Hilo)	例假日
第五天	二月五日 星期一	希洛(Hilo)	拜訪 USDA 種原中心，參觀果樹 種原
第六天	二月六日 星期二	希洛(Hilo)	拜訪 Waiakea 實驗站的 Mrs. Lichty 參觀該實驗站在火鶴花 及石斛蘭育種計畫之執行情 形。 參觀 Green Point Nurseries 副總經理 Mr. Eric. S. Tanouye.
第七天	二月七日 星期三	希洛(Hilo)	拜訪 James Fang (Hilo Orchid Farm) 蘭園及 Marco Chen 的 Winning Orchid Farm。
第八天	二月八日 星期四	希洛(Hilo)	拜訪夏威夷大學合作推廣中心 的 Mr. Kelvin Sewake. 中午拜訪 夏威夷大學的柯文雄 教授

日次	日期	地點	活動內容
第二十二天	二月二十二日 星期四	Miami-Orlando	參觀 Fairchild Tropical Garden 下午搭機至 Orlando.
第二十三天	二月二十四日 星期五	奧蘭多	拜會 Disney World 園藝部門， 參觀其動物世界園區收集植物 材料及運用流程。餐訪艾波卡 中心的水耕系統
第二十四天	二月二十五日 星期六	奧蘭多	例假日
第二十五天	二月二十六日 星期日	奧蘭多	例假日
第二十六天	二月二十七日 星期一	奧蘭多	拜訪 Twyford Plant Laboratories, Inc. 下午拜訪 Hermann Engelmann Greenhouses, Inc.
第二十七天	二月二十八日 星期二	奧蘭多-檀香山	返程

伍、研習及參訪心得

一、 夏威夷的火鶴花與蘭花產業：

夏威夷 1999 年的火鶴切花產值約 10,700 萬美元，大多集中於大島（夏威夷島），約 1550 萬枝、650 萬美元。主要品種為夏威夷大學及當地私人育種家培育之品種及來自荷蘭的品種，並由夏大的 Kelvin T. Sewake 負責推廣教育的工作。GreenPoint Nurseries 是當地一家以火鶴花生產為主的花卉外銷公司，夏大選育的新品系送到該場進行商業評估，並就商業觀點評估新品系之市場競爭力。據該公司副總經理 Eric 表示：該公司對細菌性葉枯病的對策是從田間衛生管理做起，一有病株立刻清除並噴藥防治，平常管理即要求人員分區負責，並遵循設定好之工作模式，不可以任意於田間走動，以此一方式已有效控制葉枯病的發病。該場大部份採用簡易遮光網，少數生產盆花的區域才採防雨棚設施。

當地的私人育種家 Midori farms 的 Calvin K.Hayashi 近幾年推出 Midori、Jasmine 等綠色新品種在國際市場頗受好評，另一個粉色帶紅色噴點的品種-Shiboru 則為其兄所培育出。關於夏威夷火鶴花大多未申請專利的問題，Calvin 認為是當地民風保守又不希望好品種流入國際市場，而他則採取合作方式，將培育的新品種登錄後，授權荷蘭的 Anthura 公司繁殖販售，而達互利的目的；近年來夏威夷的火鶴花協會也認同此一方式，開始將品種授權給其他公司繁殖販售。至於與美國本土組培公司合作之可行性，Calvin 認為可行性不高，因美國本土只有盆花火鶴的市場，在國際間切花品種種苗之競爭力不夠。

夏威夷栽培的蘭花以石斛蘭為主，1999 年產值達 950 萬美元，其中 60-70% 為盆花。由於泰國在石斛蘭育種上的優勢，夏威夷當地的石斛蘭品種仍以泰國進口為主，夏大自行培育之品種在市場上的佔有率偏低。

由於石斛蘭性喜溫暖及適度的光照，農場大多集中於大島的南端及歐胡島，而歐胡島的 Waianae 地區因週年日照充足，生產石斛蘭盆花的品質遠優於其他地區。夏威夷石斛蘭盆花主要運送美國本土，由於同屬國內販售，只要是無土介質，並無其他限制，而其他國家的石斛蘭盆栽必須裸根進入美國本土，再經一段期間的培育後才能販售，即使種苗在價格上有優勢，整體生產成本也無法與夏威夷競爭。

除石斛外，近年來如蝴蝶蘭、文心蘭、拖鞋蘭產業也在夏威夷逐漸擴展；與泰國的蘭花事業比較可以發現，夏威夷因地理條件上的優勢，幾乎全年均可以看不同的蘭花綻放，較不受季節的影響。

在大島的參訪行程中可以發現：夏威夷的火鶴花與蘭花業者大多很保守，且視台灣為其潛在的威脅者，資訊上不太願意溝通，是此行較大的遺憾。

二、 美國的蝴蝶蘭產業

蘭花產業近十年來在美國發展得相當迅速，依據美國農部的統計資料顯示 1999 年全美蘭花的拍賣金額總額排名第二，僅次於聖誕紅，生產地主要分佈於佛羅里達、加州及夏威夷州，其次為伊利諾、紐約州、賓州與德州等地。蘭花產業在美國急速發展的的最大因素是，台糖的蝴蝶蘭催花苗以低價進入美國市場，在美國當地的生產者購買種苗後，

在溫室內栽培三個月後即可送至拍賣市場販售，無論資金或溫室的周轉率都相當快。

由於美國地域廣闊，氣候環境之差異大，對品種之選擇性相當高，以德州的 Butterfly Orchid Inc. 為例，該公司曾經自台糖進口多個不同代號之蝴蝶蘭催花苗，經種植後發現其中一個斑點粉紅色的品種耐熱性佳，很適合當地夏季生產，但當該公司向台糖再次定貨時，台糖公司卻表示該一代號品系已不再生產。此一現象顯示台糖公司的品種明顯影響美國市場，但相對的台糖公司也未對下游客戶的需求適度的重視。對整體蝴蝶蘭的產業發展，業者有兩極的看法，一部份業者認為未來蝴蝶蘭產業可望超過聖誕紅，成為全美銷售金額最高的盆花；但令一些觀葉植物的生產業者則認為，蝴蝶蘭產業過度膨脹，可能會再五至十年後衰退。

三、 佛州的 Oglesby Plant International, Inc.

Oglesby 植物組織培養公司位於佛羅里達州西北的 Altha 附近，主要從事天南星科觀賞作物的育種及種苗生產，其中火鶴花兩白鶴芋是該公司的重點發展作物。Oglesby 的火鶴花育種計畫以盆花品種為主，早期推出 Ruth 系列，近年來該公司推出之 Small talk 系列的專利品種在美國本土頗受歡迎，其特色是所需之栽培期短，組培穴盤苗至開花僅需 22-24 週，而且植株矮小，包裝運輸時較不佔空間。在盆花育種上，該公司育種部主任表示 *A. amicola* 的耐寒性不佳，佛羅里達北部冬季低溫之忍受性差，並不是良好的育種親本。其他如將合果芋“Pixie”經由放射線誘變，篩選出矮性且成株依舊保存叢生狀的新品種“Glo-Go”。

四、 佛州 Jacksonville 的園藝概況

Jacksonville 位於佛羅里達州北部、緊鄰大西洋，是全美面積最大的城市，除市中心外，外圍地區之林木覆蓋率相當高，業餘園藝相當興盛。位於市中心的 Cummer 藝術博物館與花園保存傳統英國式及義大利式庭園，並提供教育功能。該地的園藝俱樂部成立於 1923 年，目前擁有 1500 名會員，是全美最大的業餘園藝俱樂部。

當地的 Loop's Nursery 以水牆式降溫及光週控制，於當地夏季高溫高濕的環境下週年生產盆菊，以每週一個生長季，周轉相當快速，其他栽培作物包括麗格海棠、非洲堇、天南星科觀葉植物、鬱金香、百合等及組合式盆栽，近年來也嘗試生產彩色海芋的盆花。另一家 Halsema Greenhouses 僅有簡易的塑膠溫室，主要生產繡球花、觀葉植物、球根盆花及草花苗，由於經營者無法掌握客源，所生產之成品經常有無法出貨之情形，如本年度 Easter lily 生產即在無特定客源下仍大量生產。另一不利因素是：無降溫及遮陰的溫室在當地夏季無法生產園藝作物，全場幾呈休工狀態。

五、 邁阿密的種原保存園

美國農部位於邁阿密的種原保存園是美國本土內最大的亞熱帶園藝作物研究中心，佔地 197 英畝，目前主要的任務分別是熱帶果樹如芒果、酪梨、荔枝、楊桃及甘蔗的種原保存，收集、馴化適合當地需求的新品種，並提供其他研究機構所需種原；其次為加勒比海果實蠅的防治研究。果實蠅於 1965 年曾重創佛羅里達果樹產業，此後該中心即尋求改進當地生產的果實或蔬菜採後處理模式，及果實蠅防檢制度。觀

賞植物的種原保存以棕櫚科及榕樹類植物為主，其他如孤挺花及百合水仙之收集選育也曾是該中心的研究項目。

六、 迪斯尼世界的園藝部門

Walt Disney World 的園藝部門擁有超過 650 個員工，負責整個迪斯尼世界旅館區及各主題樂園內的 3500 英畝景觀佈置，其中的動物王國於 1995 年開始開始設園，為收集可資利用的熱帶雨林植物，該集團派駐有多人於主要雨林地區收集種原，並送回迪斯尼世界園藝部的溫室培養繁殖，Epcot 中心的水耕世界除配合展示發展不同的水耕系統外，於美國太空總署太空計畫中協助發展水耕蔬菜與果樹生產系統，近年也嘗試開發家庭式水耕系統，並生產有機蔬菜提供該集團餐飲部門使用。在生物防治上該中心每年釋放一百多萬隻的瓢蟲防治 white fly。

七、 Tywford 植物組織培養公司

Tywford 植物組織培養公司是全球最大的園藝作物組織培養公司，擁有四個實驗室分佈於美國加州的 Santa Paula、佛州的 Apopka、及哥斯達黎加的，其中位於佛州的 Apopka 試驗中心是該公司最大的試驗站，約 60% 的產品由該中心釋出。

Apopka 試驗室生產的種苗以天南星科觀賞植物為主，其他如非洲菊、金針花也是生產項目之一，同時也自中南美洲進口插穗扦插繁殖。有鑑於蝴蝶蘭在美國市場的蓬勃發展，該公司近年來也接受蝴蝶蘭委託代工的工作，生產蝴蝶蘭種苗。

以天南星科觀賞作物為例，Tywford 的品種大多來自佛羅里達大學 Apopka 研究與教育中心或與私人育種者間之合作模式，鮮少為該公

司自行開發的品種。

八、 Apopka 地區的 Hermann Engelmann Greenhouses Inc.

Hermann Engelmann Greenhouses 成立於 1971 年，擁有位於八個不同地點，供兩千兩百萬平方英尺的溫室面積，主要生產室內觀賞盆栽，生產的作物種類超過 250 個品種，並以”Exotic Angel”品牌行銷全美。該公司並提供國際交換學生實習的機會並提供食宿與零用金，實習的學生多經由學校推薦參與實際生產運作，對有興趣實際從事園藝事業的學生提供一個很好的磨練機會。

所參觀的苗圃包括盆栽生產區、蕨類及長春藤生產區與木本觀葉植物採穗母本園。由於觀賞植務需經運輸至消費地，生產規畫上其最終產品以不超過一英尺高為主，因此在選擇所生產的種類或品種時，蔓性或矮性品種為其優先考慮。就盆栽火鶴來說，佛羅里達大學及 Oglesby 所培育出之矮性品種，如 SmallTalk 系列即遠優於荷蘭 Anthura 所推出之盆花品種。

陸、建議事項：

- 一、在國內種苗法未臻健全前，政府單位培育出之花卉新品種，是否可以考慮委託國外種苗商或代理商協助在國際市場登錄品種，甚至委託銷售，如同夏威夷私人火鶴育種家Calvin將其品種委由荷蘭Anthurum公司繁殖銷售。
- 二、基因轉殖技術因作物別，流程各有差異，也因目標基因來源之差異，經轉殖後在轉植株上之性狀表現，並不一定如預期，如夏大在石斛蘭花色基因轉殖上，已篩選得基因轉殖植株，但在田間表現上花色與原親本並無明顯差異。
- 三、夏威夷大學的火鶴花種原繁多，而 Oglesby Plant International, Inc.及佛州大學Apopka研究與教育中心的Dr. Henny在盆花育種上經驗豐富，未來國內如有加強火鶴花產業之需求，可結合這些優勢，邀請美國及荷蘭之專家來台指導。
- 四、由Loops' Nursery 及Hermann Engelmann Greenhouses Inc.的經營模式可以瞭解，即使在如佛羅里達夏季高溫高濕的環境下，以單純的塑膠溫室配合水牆降溫，也可以生產高品質的盆花，如菊花、麗格海棠等盆栽。
- 五、對未來相關計畫項下如有參訪行程，建議由實習人員與指導教授協商，確定參訪對象後，再委由美國農部代為接洽受訪單位並安排行程，將會更有實質收穫。本次參訪部份行程因僅向美國農部提出概略之需求，行程與實際需求仍有差異。

柒、附圖：



照片一：夏威夷大學選育中的火鶴花新選系。



照片二：夏威夷的石斛蘭盆花品種。



照片三：夏威夷 Green point Nursery 的火鶴花集貨場。



照片四：Hilo 地區苗圃以火山石塊種植 SmallTalk 盆栽火鶴品種。

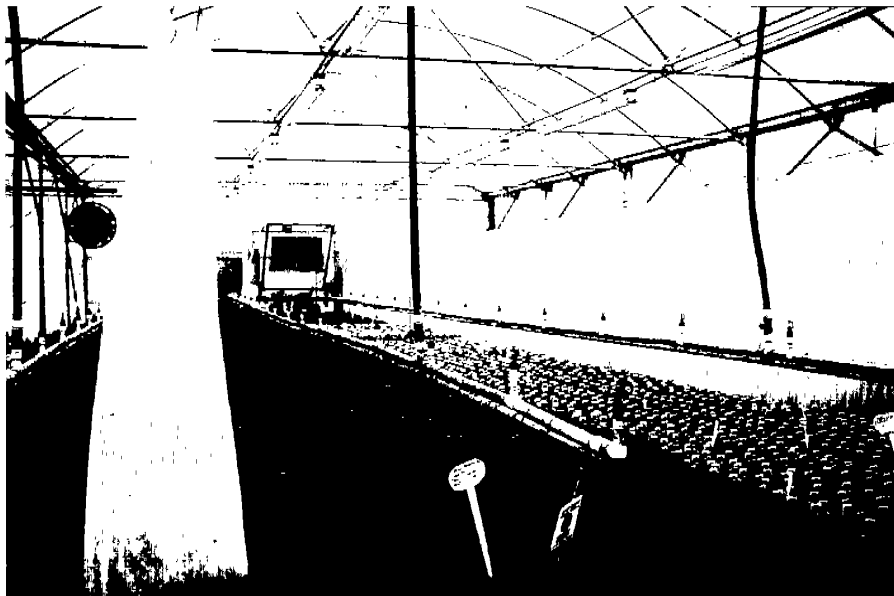


照片五：德州原生的豆科植物，是當地很美觀又具香氣的庭園木。



照片六：Oglesby 公司的育種部主任與該公司輻射誘變的合果芋新品種。

右為原始品種，左為誘變出之新品種-“Glo-Go”



照片七：Jacksonville 附近 Loop's Nursery 光照處理設施。



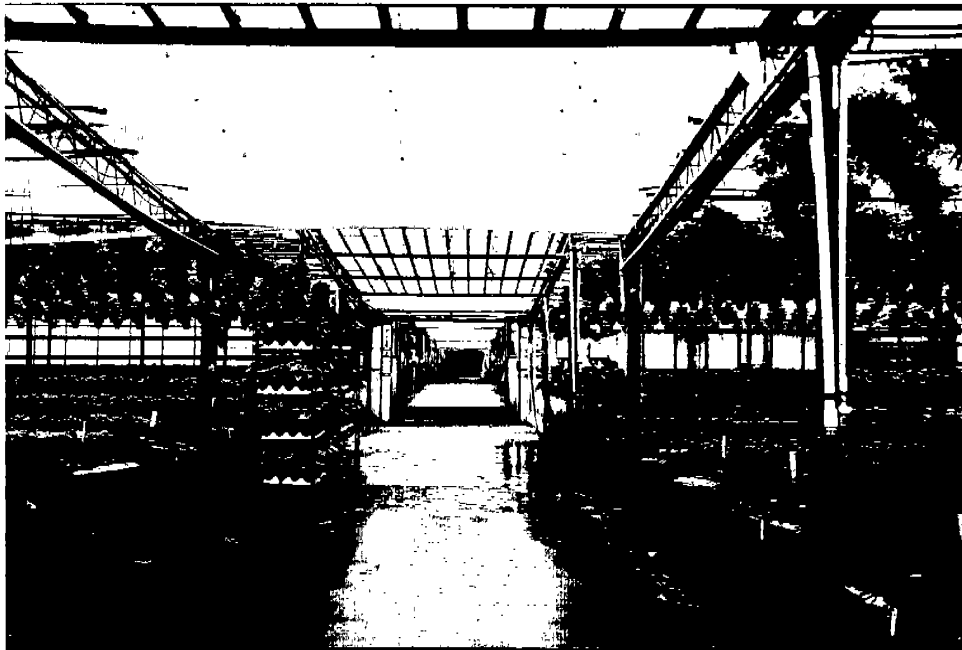
照片八：邁阿密地區 Fairchild 熱帶花園的觀賞鳳梨展示溫室。



照片九：Disney World 水耕中心開發的立體水耕系統。



照片十：Twyford 公司經理與該公司生產的火鶴花組培苗。



照片十一：Hermann Lohmann Greenhouses 的苗圃設施。



照片十二：Hermann Lohmann Greenhouses 以立體化設施栽培蕨類與長春藤盆栽。