

由 *Phomopsis mangiferae* 引起之檬果採收後病害發生調查 及防治藥劑篩選

黃巧雯¹ 楊宏仁² 林靜宜¹ 許淑麗³ 賴素玉³ 柯文琪³ 倪蕙芳^{4,*}

摘要

黃巧雯、楊宏仁、林靜宜、許淑麗、賴素玉、柯文琪、倪蕙芳。2015。由 *Phomopsis mangiferae* 引起之檬果採收後病害發生調查及防治藥劑篩選。台灣農業研究 64(1):21–31。

Phomopsis mangiferae 係引起台灣檬果果實果腐病及蒂腐病病原菌之一，本研究針對該病原菌進行其在田間引起病害之發生率調查及其防治藥劑篩選評估。由 2009–2011 年間在台南市玉井及官田地區之愛文檬果果實採後病害調查資料顯示，官田地區檬果果實發生採後果腐或蒂腐病之平均罹病率有 51.5%，皆由 *P. mangiferae* 所引起，明顯高於玉井地區之 11.9%。由此得知，官田地區的果腐病或蒂腐病之主要病原菌為 *P. mangiferae*。續將 3 株 *P. mangiferae* 分離株之分生孢子無傷口接種於田間檬果樹上之未成熟果實，結果顯示大部分果實均可於果實採收後於接種部位出現果腐病斑，顯示本菌於無傷口接種時亦具有感染能力。測試賽普護汰寧、貝芬依滅列、依普同、腐絕、貝芬菲克利、免得爛、甲基多保淨、亞托待克利、亞托敏及得克利等 10 種藥劑對 *P. mangiferae* 之菌絲生長及孢子發芽影響，結果顯示得克利、亞托待克利及貝芬菲克利在 10–100 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度下，對所測試之 3 株 *P. mangiferae* 菌株具有 97% 以上之菌絲生長抑制率；而賽普護汰寧、亞托敏及亞托待克利處理下，則可顯著降低病原菌之分生孢子發芽率。以上藥劑皆為目前檬果炭疽病之推薦防治藥劑，於田間防治時可參考作為防治由 *P. mangiferae* 引起之採收後病害之用。

關鍵詞：白檬果、採收後病害、*Phomopsis mangiferae*、藥劑篩選。

前言

檬果 (*Mangifera indica* L.) 為台灣重要經濟果樹之一，根據 2012 年行政院農業委員會農業統計年報資料 (<http://www.afa.gov.tw/Public/Grain-Statistics/20131029151177055.pdf>) 顯示，檬果栽培面積約有 16,356 ha，年產量為 167,247 Mg，主要栽培產地依序為台南市、屏東縣及高雄市等。常見的栽培品種有在來種(土檬果)、愛文、金煌、凱特及海頓等。

檬果果實採收後病害主要有 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. 引起之炭疽病及葡萄座腔菌科 (Botryosphaeri-

aceae) 真菌與擬莖點霉屬之 *Phomopsis mangiferae* S. Ahmad 等病原所引起的果實腐爛包括蒂腐，此類病害多具潛伏性，常於採收黃熟後方出現病徵，進而降低櫥架壽命並影響外銷果實品質 (Ann & Yang 2003; Ko *et al.* 2009; Iram *et al.* 2013)。葡萄座腔菌科 (Botryosphaeriaceae) 真菌已知廣泛存在世界各地，可造成許多植物潰瘍、枝枯、葉斑、果腐等病徵 (Slippers & Wingfield 2007; de Macedo & Barreto 2008; Yu *et al.* 2009; Ni *et al.* 2012; Úrbez-Torres *et al.* 2013)。Ni *et al.* (2012) 近年來釐清在台灣引起檬果嚴重果腐病之主要

投稿日期：2014 年 9 月 15 日；接受日期：2014 年 11 月 24 日。

* 通訊作者：hfni@dns.caes.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。

² 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所研究員兼分所長。台灣 嘉義市。

³ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系研究助理。台灣 嘉義市。

⁴ 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

病原，包括 *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.、*Neofusicoccum mangiferae* (Syd. & P. Syd.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips、*Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips、*Fusicoccum aesculi* Corda 等，此四種均屬於葡萄座腔菌科。而本研究中所探討的 *Phomopsis* 屬則為腔胞菌綱 (Coelomyctes) 真菌中的一個大屬，其有性世代歸為子囊菌 (Ascomycotina) 的 *Diaporthe* 屬，目前的種名約超過 1,000 種，為寄主種類繁多之重要植物病原真菌 (Rossman *et al.* 2007; Gomes *et al.* 2013)。根據美國植物病理學會病害名彙 (<https://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/default.aspx>) 紀錄，*Phomopsis* 屬在多種果樹上造成的果實病害有由 *Phomopsis perseae* Zerrova 引起的酪梨果腐病、由 *Phomopsis* sp. 引起的木瓜果腐病、由 *Phomopsis mangiferae* S. Ahmad 引起的檬果蒂腐病 (Ploetz *et al.* 1994)、由 *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc. 引起的葡萄果腐病 (Pearson & Goheen 1988)、由 *Phomopsis mali* Roberts 引起的桃或蘋果果腐病 (Rosenberger & Burr 1982) 等，而台灣植物病害名彙 (Hsu *et al.* 2002) 所記錄則有由 *Phomopsis citri* Fawc. 引起的柑橘黑點病或褐色蒂腐病、*Phomopsis fukushii* Tanaka *et* Endo 引起的梨枝枯病及蘋果褐腐病、*P. mali* Roberts 引起的梨蒂腐病及蘋果果腐病、*Phomopsis vitimegasora* Kuo and Leu 引起的葡萄枝枯病及由 *Phomopsis* sp. 引起的柑橘流膠病或番石榴果腐病。其中，已知 *P. mangiferae* 在澳大利亞、巴西、中國、古巴、印度、馬來西亞、美國及台灣等各國檬果產地，為引起檬果果實發生嚴重果腐之病原 (Ploetz *et al.* 1994; Ko *et al.* 2009; de Oliveira Costa *et al.* 2010; Ni *et al.* 2012; Trakunyingcharoen *et al.* 2014)。

在檬果採後病害調查中，果腐病常與炭疽病同時出現在果身上，且病徵易被無經驗者混淆，彼此間病徵差異在於炭疽病病斑顏色為炭黑色、凹陷、病斑保持乾硬且病勢進展較慢並常顯現淚斑狀，炭疽病菌侵入果肉較淺約 10–20 mm 深度，當環境潮濕時則在病斑上產

生橘紅色孢子堆；而由 Botryosphaeriaceae 科引起果腐病之病徵為果皮呈現水浸狀、病斑顏色較黑、周緣常呈不規則狀，病斑可延伸至果肉內，造成果肉腐爛；此外，由 *P. mangiferae* 引起果腐病之病斑顏色較淺、周緣圓形且較平滑，病斑進展較緩慢，仍亦使果皮呈現水浸狀，造成果肉腐爛而失去商品價值 (Ploetz *et al.* 1994; Cooke *et al.* 2009; Ni *et al.* 2012)。

有關檬果採後病害防治上，炭疽病主要防治方式有注意田間衛生、於開花期至果實套袋前進行化學防治、套袋及採後溫水處理或蒸熱處理等 (Ann *et al.* 1998; Chan 2009; Kumah *et al.* 2011)。其中，在田間化學防治上，目前植物保護手冊推薦於檬果炭疽病之防治藥劑已有 33 種 (Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture n.d.) 供農友交替使用。而由 Botryosphaeriaceae 科真菌所引起的檬果果腐病之防治藥劑中，其貝芬替 (Carbendazim) 可有效控制由 *L. theobromae* 引起之檬果果腐病發生 (Bhatt & Jadeja 2010)；而 Ni (2012) 於田間進行檬果果腐病防治效果評估試驗，亦指出亞托敏 (Azoxystrobin) 施用可有效地降低由 Botryosphaeriaceae 科真菌所引起的檬果果腐病之發生。

雖然過去已有 *P. mangiferae* 引起檬果採後病害之記載，然而在台灣從未針對此病害進行田間及果實採收後發生率相關調查，且亦無有效防治方法可供農友使用。因此，在炭疽病控制良好的檬果園，仍有此類病原菌反而成為危害果實之主要病因。為此，本研究在台灣台南市玉井及官田地區分別進行由 *P. mangiferae* 引起採後病害發生調查，來瞭解此病害在台灣檬果產區之發病嚴重程度，並進行防治藥劑篩選評估，以作為未來相關病害防治之參考。

材料方法

P. mangiferae 引起之檬果採收後病害調查及病原分離

2009–2011 年連續 3 年於台南市玉井及官田地區共 45 個愛文檬果園進行果實採集，每

個果園隨機摘取 20 顆套袋約 8 分熟之硬熟果實，於實驗室內拆除套袋逐一標示。以電石催熟 2 d 後，逐一置於小塑膠籃內以避免果實互相汙染，再以大型塑膠袋保濕 2 d 後，置於室溫中，並於催熟後 7 d 調查果實病害之發生情形。果實病害發生率之計算公式如下：罹病率 (disease incidence, %) = (產生果腐病斑或蒂腐病斑果實數/全部調查果實數) × 100%。

此外，並選取具有果腐病或蒂腐病之果實進行組織分離，罹病果表皮以 75% 酒精直接擦拭表面，待表面酒精揮發後，以滅菌解剖刀切取病斑內病健部交接處大小約 2–3 mm² 組織，置於以乳酸 (lactic acid) 酸化 PDA (acidified PDA) 平板上 (pH 3.8)。其配製方法為將 50% (v/v) 乳酸溶液 750 μL，加入經滅菌後降溫到 55℃ 之 300 mL PDA (potato dextrose agar, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 中輕晃混勻。置於室溫下培養約 7 d 後，挑取如 Punithalingam (1993) 所述，具典型 *Phomopsis* 特徵，即生長緩慢且為灰白色至淡褐色之綿密狀菌落，將菌落邊緣之菌絲尖端移至 PDA 平板上，待產孢後，將其孢子塗佈於 2% 水瓊脂 (water agar; WA) 平板上進行單孢分離。所得之分離株依據 Punithalingam (1993) 與 Ko *et al.* (2009) 之形態學鑑定為 *P. mangiferae*，並將分離株培養於 PDA 斜面，並置於 8–10℃ 冰箱中保存。另外，由 *P. mangiferae* 在田間造成檬果果實病害之發生率之計算公式如下：發生率 (occurrence frequency, %) = (由果腐病斑或蒂腐病斑分離出 *P. mangiferae* 之果實數/果實發生果腐病或蒂腐病之總數) × 100%。

接種源配製

從保存管中將分離菌株菌絲塊移植 PDA 平板上進行活化，於 25℃ 無光照之恆溫箱中培養約 4–5 d 後，切取菌絲尖端，繼而移植至 PDA 平板上培養 1–2 wk。待其產孢後，以無菌水洗下培養皿內所產生之分生孢子，並利用血球計數器 (hemacytometer, Bright-Line, USA) 測定孢子濃度，再以無菌水調製濃度為 200 conidia μL⁻¹ 之孢子懸浮液供試驗果實接種用。本研究所用 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550

菌株為來自台南市官田地區愛文品種之罹病果所分離的 *P. mangiferae* 菌株。

病原性測定

於農業試驗所嘉義農業試驗分所之愛文檬果園進行植體果實上之接種試驗，以微量滴管吸取 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 分離株之孢子懸浮液各 2 μL (約 100 個孢子)，滴在尚未成熟之青綠色中果期果實後，隨即在其上覆蓋 20 μL 尚未凝固之 1.5% 水瓊脂培養基 (water agar; WA) 以便將孢子懸浮液固定於果實上，再以透氣膠帶將 WA 固定於果實表面。接種後之果實隨即進行套袋，以避免後續自然狀態下其他病原之感染，每一株菌株接種 15 顆果實，每個果實僅做一個接種點，對照組則以無菌水進行接種。接種後 6 wk，將果實採收以電石催熟後，置於室溫 2 wk 後進行觀察及記錄接種點果腐病發生情形，本試驗重複進行 2 次。

藥劑對 *P. mangiferae* 菌絲生長之影響

將供試菌株 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 移植至 PDA 平板上，於室溫培養 3 d 後，以滅菌過孔徑 0.5 cm 之打孔器切取菌絲塊供試，並利用藥劑平板測試法測定供試藥劑之抑菌效果。所使用 10 種藥劑及種類如下：62.5% 賽普護汰寧水分散性粒劑 (cyprodinil + fludioxonil, 先正達股份有限公司)、40% 貝芬依滅列可濕性粉劑 (carbendazim + imazalil, 正農化學股份有限公司)、23.7% 依普同水懸劑 (iprodione, 雅飛有限公司)、40% 腐絕可濕性粉劑 (thiabendazole, 富農化學工業股份有限公司)、34.5% 貝芬菲克利可濕性粉劑 (carbendazim + hexaconazole, 台益有限公司)、80% 免得爛水分散性粒劑 (metiram, 巴斯夫股份有限公司)、70% 甲基多保淨可濕性粉劑 (thiophanate methyl, 好速股份有限公司)、32.5% 亞托待克利水懸劑 (azoxystrobin + difenoconazole, 先正達股份有限公司)、23% 亞托敏水懸劑 (azoxystrobin, 先正達股份有限公司)、及 26% 得克利水基乳劑 (tebuconazole, 拜耳股份有限公司)，配製成含有有效成分濃度為 1 mg a.i. L⁻¹、10 mg a.i. L⁻¹、100 mg a.i. L⁻¹ 之 PDA 培養基，另以不添加藥劑之 PDA 平

板作為對照。將上述直徑 0.5 cm 的菌絲塊，菌絲面朝下置入直徑 8.5 cm 之含藥的 PDA 培養基平板中央，置於 25°C 之定溫箱中黑暗培養，於培養後第 14 d 測量其菌絲生長直徑，每處理 6 重複，本試驗重複進行 3 次。試驗結果按下列公式換算藥劑對菌絲之生長抑制率：抑制率 (%) = [(對照組平均生長直徑 - 藥劑處理組平均生長直徑)/對照組平均生長直徑] × 100%。

藥劑對 *P. mangiferae* 分生孢子發芽之影響

以無菌微量吸管吸取 50 μL 上述不同藥劑之溶液，置於 3 凹載玻片之凹槽內，再以無菌微量吸管吸取 1 μL 供試之 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 孢子懸浮液 (200 conidia μL⁻¹)，滴於上述含農藥之載玻片凹槽內，並混合均勻，使凹槽內混合液之有效成分濃度為 10 mg a.i. L⁻¹。供試載玻片置於加有 5–10 mL 無菌水之 8.5 cm 塑膠培養皿中，以避免玻片水分蒸散，並將培養皿置於 25°C 之定溫箱中，經 24 h 後於顯微鏡下逢機計算 100 個孢子之發芽率。每個處理 2 皿，共 6 重複，本試驗重複進行 3 次。以滅菌蒸餾水處理做為對照組。

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS 9.1 版統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of vari-

ance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗在 5% 顯著水準下，比較處理間平均值之差異。

結果

P. mangiferae 引起之檬果採收後病害調查

本研究於 2009–2011 年由台南市玉井及官田地區共採樣 45 個愛文檬果園進行果腐病及蒂腐病病害調查，其中玉井地區共調查 22 個果園 (149 顆果實)、官田地區共調查 23 個果園 (282 顆果實)。果實總數 431 顆，其中有 162 顆果實 (玉井地區有 55 顆、官田地區有 107 顆) 於蒂頭部位出現腐爛病徵，亦有 342 顆果實 (玉井地區有 105 顆、官田地區有 237 顆) 於果身出現腐爛病徵，其調查結果如表 1 所示。連續 3 年玉井地區果園內果實果腐病或蒂腐病罹病率依序為 50.0、27.5 及 31.8%，3 年平均罹病率為 36.4%；而官田地區果園內果實果腐病或蒂腐病罹病率依序為 63.0、75.6 及 73.2%，3 年平均罹病率為 70.6%。

進一步將罹病果實進行組織分離，分析由 *P. mangiferae* 所引起之果實病害發生率，如表 1 所示。玉井地區果園內罹病果實由 *P. mangiferae* 引起之病害發生率依序為 30.5、29.0 及 38.8%，3 年平均發生率為 32.8%；而官田地區則依序為 74.8、76.3 及 67.6% 之 *P. mangiferae* 發生率，3 年平均發生率為 72.9%。結

表 1. 2009–2011 年在台南市玉井區及官田區檬果蒂腐病或果腐病之罹病率及 *Phomopsis mangiferae* 病原之發生率。

Table 1. The incidence of stem-end rot or fruit rot disease and occurrence frequency of *P. mangiferae* on mango fruits diseases in Yujing and Guntain area during 2009–2011.

Location	Year	Disease incidence (%) ^z	Occurrence frequency of <i>P. mangiferae</i> (%) ^y
Yujing	2009	50.0	30.5
	2010	27.5	29.0
	2011	31.8	38.8
Guntain	2009	63.0	74.8
	2010	75.6	76.3
	2011	73.2	67.6

^z Incidence of mango stem-end rot or fruit rot in each area was evaluated by the following formula: Disease incidence (%) = (Number of fruits which showed symptoms of stem-end rot and fruit rot/Total number of fruits) × 100%.

^y Occurrence frequency of *P. mangiferae* (%) = (Number of fruits colonized by *P. mangiferae*/Total number of fruits with stem-end rot and fruit rot symptoms) × 100%.

果得知，官田地區由 *P. mangiferae* 引起檬果果實之果腐病或蒂腐病發生率明顯高於玉井地區。此外，病徵觀察中亦得知 *P. mangiferae* 可引起兩種類型病徵表現，其中一型病徵可直接由果身開始進展者之果腐病 (圖 1A)，另一型病徵是由果蒂向果身進展之蒂腐病 (圖 1B)，其病斑均為淺褐色至褐色圓斑、病斑邊緣圓滑、按壓果皮易破裂流汁、無炭疽病之淚斑狀現象。

病原性測定

接種結果確認 *P. mangiferae* 於檬果果實上病原性，並作為未來進一步藥劑試驗之供試菌株。將 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 分離株之分生孢子分別接種於田間未成熟之中果時期檬果果實，結果如表 2 所示。在第 1 次試驗於田間接種 Ph-453 分離株孢子懸浮液之 15 顆檬果果實中，有 9 顆果實在接種點產生果腐病斑，而在接種 Ph-546 及 Ph-550 分離株孢子懸浮液之各 15 顆檬果果實中，因有些自然落果，故採回實驗室的果實分別為 14 顆與 13 顆，然其中仍各自有 11 顆果實於接種點產生果腐病斑，3 株菌株也經第 2 次試驗再次確認病原性，而對照組之檬果果實則未表現病徵 (表 2、圖 1C、1D)。將接種點產生之果腐病斑再次進行組織分離，完成科霍氏準則 (Koch's postu-

lates) 證實 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 三菌株對檬果具有病原性。

藥劑對 *P. mangiferae* 病原菌菌絲生長之影響

將供試藥劑添加於 PDA 平板上，測試各藥劑對 *P. mangiferae* 病原菌菌絲生長之抑制情形，結果如表 3 所示。賽普護汰寧於 1 mg a.i. L⁻¹ 有效成分藥劑濃度下，對 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 分離株之菌絲生長抑制率分別為 95.1、97.0 及 93.0%，而 1 mg a.i. L⁻¹ 有效成分藥劑濃度之得克利對 3 株菌株之菌絲生長抑制率則為 90.7、94.3 及 87.9%。若於 10 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度下，得克利對上述 3 株菌株之菌絲生長抑制率皆為 100%。而亞托待克利對 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 菌絲生長之抑制率分別為 100、100 及 98.4%，甲基多保淨對 Ph-543 之菌絲抑制率為 6.8%，但對 Ph-546 及 Ph-550 菌絲生長抑制率則僅有 10.1% 及 9.2% 的抑制率；免得爛則對 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 菌絲生長抑制率則分別僅有 19.0、27.5 及 7.4%。若有效成分濃度提高至 100 mg a.i. L⁻¹ 下，則貝芬依滅列、貝芬菲克利、亞托待克利及得克利對 Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 菌絲皆達到 100% 的

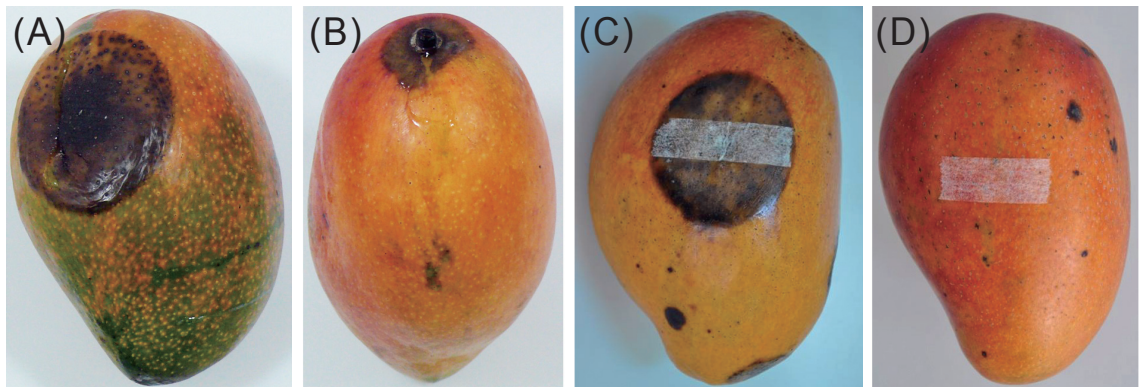


圖 1. 由 *Phomopsis mangiferae* 引起檬果採後病害之病徵。(A) 由果身開始進展者之果腐病；(B) 由果蒂進展之蒂腐病；(C) 愛文檬果果實無傷口接種 *P. mangiferae* Ph-550 分離株之分生孢子後之果腐病病徵；(D) 以水作為對照組。

Fig. 1. Post-harvest diseases of mango fruit showing symptoms of fruit rot (A) and stem-end rot (B) caused by *P. mangiferae*. Symptoms of mango fruit rot by *P. mangiferae* Ph-550 (C) isolate following inoculation on non-wounded fruit in the field. (D) Inoculation with sterile water as control.

表 2. 測定不同 *Phomopsis mangiferae* 分離株之病原性及致病力。Table 2. Pathogenicity test on differential isolates *P. mangiferae* and their virulence.

Isolate ^z	No. diseased/No. harvested fruit ^y	
	Exp. 1	Exp. 2
Ph-453	9/15	12/14
Ph-546	11/14	11/15
Ph-550	11/13	12/14
Control	0/12	0/14

^z Spores suspension (50 conidia μL^{-1}) of *P. mangiferae* were inoculated on the immature mango fruits in field.

^y Four to six weeks post inoculation, the fruits were harvested and ripened by calcium carbide treatment. Disease incidence of fruit rot recorded at the 14th days mango fruits harvest.

表 3. 不同殺菌劑對 *Phomopsis mangiferae* Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 分離株菌絲生長之影響。Table 3. Effects of different synthetic fungicides on mycelial growth of *P. mangiferae* Ph-453、Ph-546 and Ph-550 isolate.

Fungicide	Inhibition (%) ^z								
	1 mg a.i. L ⁻¹			10 mg a.i. L ⁻¹			100 mg a.i. L ⁻¹		
	Ph-453	Ph-546	Ph-550	Ph-453	Ph-546	Ph-550	Ph-453	Ph-546	Ph-550
62.5% cyprodinil + fludioxonil (WG)	95.1 b ^y	97.0 a	93.0 a	95.7 ab	97.0 a	94.0 b	96.4 b	97.0 a	95.2 b
40% carbendazim + imazalil (WP)	100.0 a	9.2 g	7.3 d	100.0 a	88.1 b	79.4 d	100.0 a	100.0 a	100.0 a
23% azoxystrobin (SC)	32.6 g	44.7 e	26.5 c	39.4 c	41.6 c	26.4 e	50.5 e	48.9 d	36.0 f
23.7% iprodione (SC)	54.3 e	59.2 d	56.1 b	91.9 ab	85.6 b	89.8 c	94.2 c	90.3 bc	93.6 b
40% thiabendazole (WP)	100.0 a	5.9 hi	4.7 d	100.0 a	18.6 e	7.7 f	100.0 a	94.4 ab	86.1 c
34.5% carbendazim + hexaconazole (WP)	100.0 a	41.5 f	31.8 c	100.0 a	100.0 a	97.1 ab	100.0 a	100.0 a	100.0 a
32.5% azoxystrobin + difenoconazole (SC)	78.5 d	88.7 c	54.0 b	100.0 a	100.0 a	98.4 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
26% tebuconazole (SC)	90.7 c	94.3 b	87.9 c	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a	100.0 a
80% metiram (WG)	5.1 h	7.3 gh	5.3 d	19.0 d	27.5 d	7.4 f	84.8 d	88.4 c	73.2 d
70% thiophanate methyl (WP)	49.1 f	4.4 i	5.8 d	86.8 b	10.1 f	9.2 f	100.0 a	51.5 d	55.6 e
LSD ($P = 0.05$)	2.9	2.6	6.1	9.6	5.8	3.6	1.3	5.7	3.6

^z Inhibition (%) = [(Diameter of mycelial growth on PDA without fungicide - diameter of mycelial growth on PDA with fungicides) / diameter of mycelial growth on PDA without fungicide] \times 100%.

^y Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

菌絲生長抑制率。而亞托敏即使在 100 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度下，對 3 株菌株菌絲生長亦僅達 50.5、48.9 及 36.0% 之生長抑制率。

藥劑對 *P. mangiferae* 病原菌分生孢子發芽之影響

測試藥劑對 *P. mangiferae* 病原菌分生孢子發芽之影響，結果如表 4 所示。Ph-453、

Ph-546 及 Ph-550 分離株於 1 mg a.i. L⁻¹ 有效成份藥劑濃度下，亞托敏及亞托待克利處理其分生孢子之發芽率皆為 2.0% 以下，對於孢子發芽具有極佳的抑制性。當有效成份濃度提高至 10 mg a.i. L⁻¹ 下，賽普護汰寧、亞托敏、亞托待克利等 3 種藥劑處理下，其 3 株病原菌之分生孢子之發芽率皆為 2% 以下。而在 10 mg a.i. L⁻¹

表 4. 不同殺菌劑對 *Phomopsis mangiferae* Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 分離株孢子發芽之影響。Table 4. Effects of fungicides on conidial germination of *P. mangiferae* Ph-453、Ph-546 and Ph-550 isolate.

Fungicide	Spore germination (%) ^z					
	1 mg a.i. L ⁻¹			10 mg a.i. L ⁻¹		
	Ph-453	Ph-546	Ph-550	Ph-453	Ph-546	Ph-550
62.5% cyprodinil + fludioxonil (WG)	34.3 d ^y	38.7 e	39.3 f	0.0 b	1.3 e	0.0 e
40% carbendazim + imazalil (WP)	0.0 e	46.7 de	65.8 e	0.0 b	16.7 bc	15.0 d
23% azoxystrobin (SC)	0.0 e	2.0 f	0.0 g	0.0 b	0.0 e	0.0 e
23.7% iprodione (SC)	91.5 a	62.5 b	88.8 a	47.7 a	37.2 a	53.7 b
40% thiabendazole (WP)	0.0 e	51.8 cd	78.8 cd	0.0 b	14.5 bcd	52.2 b
34.5% carbendazim + hexaconazole (WP)	0.0 e	44.8 de	73.7 d	0.0 b	9.7 d	32.5 c
32.5% azoxystrobin + difenoconazole (SC)	0.0 e	0.0 f	0.0 g	0.0 b	0.0 e	0.0 e
26% tebuconazole (SC)	53.3 c	59.0 bc	83.2 bc	0.0 b	11.2 cd	0.0 e
80% metiram (WG)	76.7 b	79.2 a	85.3 ab	0.0 b	10.2 d	0.0 e
70% thiophanate methyl (WP)	39.8 d	62.0 b	80.2 bc	0.0 b	16.8 b	74.2 a
LSD (<i>P</i> = 0.05)	8.3	8.2	5.3	2.6	5.6	5.9

^z Spore germination (%) = (No. of spore germinate on water with fungicide/No. of spore germinate on water without fungicide) × 100%.

^y Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

有效濃度的腐絕處理下，則僅能完全抑制 Ph-453 菌株之分生孢子發芽，Ph-546 及 Ph-550 則仍分別有 14.5% 及 52.2 % 的發芽率。另外 10 mg a.i. L⁻¹ 有效濃度的甲基多保淨處理下，亦完全抑制 Ph-453 菌株之分生孢子發芽，但對 Ph-546 及 Ph-550 則仍分別有 16.8% 及 74.2% 的發芽率。而在 10 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度之依普同作用下，Ph-453、Ph-546 及 Ph-550 分離株之分生孢子發芽率分別為 47.7、37.2 及 53.7%。

討論

檬果果實的病害如炭疽病、果腐病及蒂腐病均為潛伏病害，於果實黃熟後表現病徵 (Ann & Yang 2003; Ni *et al.* 2012; Iram *et al.* 2013)。本文所探討由 *P. mangiferae* 引起之檬果果實病害亦為其中之一種，潛伏病害若未於田間進行適當防治，將於採收後造成嚴重的損失。為此，本研究就 *P. mangiferae* 在台灣檬果產區之發生情形進行調查，結果顯示台南市官田區之檬果果腐病 (包含蒂腐病) 有平均高達 51.5% 為由 *P. mangiferae* 所引起，遠

高於玉井地區之 11.9%。根據 Ni *et al.* (2012) 在屏東枋山、台南玉井及官田地區檬果果腐病害結果顯示，枋山、玉井及官田地區檬果果腐病果實由 Botryosphaeriaceae 科真菌內之 *L. theobromae*、*N. mangiferae*、*N. parvum* 或 *F. aesculi* 引起之比例分別為 60.1、74.9 及 25.1%，顯然枋山及玉井地區之檬果果腐病主要由 Botryosphaeriaceae 科真菌所引起，而官田地區由 Botryosphaeriaceae 科真菌引起之果腐病比率則相對明顯為低。此結果佐證本研究資料，可推論官田地區的果腐病害主因為 *P. mangiferae*。玉井及官田地區造成檬果果實腐爛病原菌相有如此大的差異性，是否與農友管理栽培方式、接穗來源或當地氣候因子及地形等因素有關，則仍有待進一步深入探討。但是研究顯示不同區域果園之病原菌相確實存在顯著差異性，此類此類病原菌又具潛伏感染之特性，未來進行病害防治時，應先確認果實病害之病原種類，方能對症下藥，果園必須因地制宜，方能收事半功倍之效。

擬莖點霉屬 (*Phomopsis*) 為 *Diaporthe* 之無性世代，寄主種類繁多，主要可造成植物莖

及枝條的潰瘍、枝枯、梢枯、果腐、葉斑及葉枯等 (Mostert *et al.* 2001; Thompson *et al.* 2011; Gomes *et al.* 2013; Chen *et al.* 2014)。其中，已知 *P. citri* 引起的柑橘黑點病，以及 *P. viticola* 引起的葡萄枝枯病，其病原菌皆可在枯枝上存活作為感染源 (Pearson & Goheen 1988; Tsai 2003)；另外，*P. fukushii* 引起的梨枝枯病，其病原菌潛伏於枝條內，可於梨枝條上越冬，等春季下雨時，其病原菌的孢子由枝條上形成，作為第一次的感染源，再經由風雨攜帶傳播 (Huang 2005)。因此，清除枯枝應可有效地降低此類病害發生，而由本研究之病原性測定試驗中證實，*P. mangiferae* 病原除了在果蒂造成由蒂頭開始的腐爛斑之外，亦可在椪果果身上造成腐爛病斑。推測此病原之感染途徑除，可能由枝條進入果梗進而在果蒂造成病斑外，田間分生孢子之飛濺可能為造成果身病斑的主要原因。本研究雖未證明田間分生孢子感染源之來源，不過根據 Everett *et al.* (2005) 研究資料中推論，由 *Phomopsis* sp. 引起酪梨果實採收後病害之感染源可能來自於酪梨果園內枯枝、落葉上產生之分生孢子。本研究以田間接種方式，將 *P. mangiferae* 之孢子懸浮液接種於未成熟果實上，結果得知在果實成熟後，其分生孢子接種點確實造成淡褐色腐爛病斑之發生，顯示分生孢子的存在確實可以感染果實造成椪果果腐病斑。因此，若要降低田間此病害之發生，則必須落實清除果園殘枝落葉等田間衛生工作，以有效地減少田間病原菌感染源，進而增進此病害之防治效果。

目前椪果採收後病害之防治，著重於開花至套袋前之化學防治工作，雖然國內目前並無針對 *P. mangiferae* 所擬定之推薦藥劑，因此本研究從現有已推薦在椪果炭疽病防治之 33 種藥劑中，應可初步篩選出對 *P. mangifera* 具有防治潛力之化學藥劑。本研究所測試之 3 株菌株對化學藥劑敏感度具有差異性，如甲基多保淨在 10 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度下，對 Ph-453 菌株之菌絲生長具有 86.8% 之抑制率，同時可完全抑制孢子之發芽。但其對 Ph-546 及 Ph550 則僅有 10.1% 及 9.2% 之菌絲生長抑制率，而且仍分別有 16.8% 及 74.2% 之發芽率；

腐絕在 1–100 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度下，對 Ph-453 菌株之菌絲生長皆為 100% 之抑制率，同時亦可完全抑制孢子發芽。但對 Ph-546 及 Ph-550 之菌絲生長抑制效果，則隨著藥劑有效成分濃度提高其抑制效果越佳，而孢子發芽結果亦同。顯然的，造成椪果果實病害之 *P. mangiferae* 病原菌間，其對藥劑之感受性具有差異性，至於是否與病原菌對該藥劑有耐性，抑或是對該藥劑產生抗藥性，未來仍須持續收集更多之菌株對此類藥劑感受性變化進行測試。

本研究藉由生體外測試 10 種藥劑對 3 株 *P. mangiferae* 菌株菌絲生長及孢子發芽之影響，試驗結果顯示，10 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度之得克利、亞托待克利、貝芬菲克利、賽普護汰寧及貝芬依滅列可有效抑制 3 株菌株菌絲生長，而亞托敏、亞托待克利及賽普護汰寧可顯著降低此病原菌之孢子發芽。因 *P. mangiferae* 引起之椪果果實病害屬於採後病害之一，為了有效防治此病害發生，施藥時期及施藥種類尤為重要。根據 Everett *et al.* (1999) 報告指出，酪梨植株於開花時期施用免賴得 (benomyl) 藥劑，可降低由 *Phomopsis* sp. 引起之酪梨蒂腐病發生。

另外，本研究中所測試的亞托敏為普遍用於椪果園炭疽病防治之藥劑，其屬於史托比類 (strobilurins) 藥劑，Strobilurins 類殺菌劑是由野生菇類，如 *Strobilurus tenacellus*、*Mycena galopoda* 或 *Oudemansiella mucida* 等擔子菌所產生的抗生物質 [(E)-β-methoxyacrylic acid] 修改而成 (Kraiczky *et al.* 1996)，其殺菌作用機制為抑制粒線體呼吸作用時 ubiquinone 與 cytochrome *b* 間的電子傳遞，使細胞 ATP 無法順利合成而達到殺菌效果 (Avila-Adame *et al.* 2003)。目前市面上此類藥劑已有克收欣 (kresoxim-methyl)、亞托敏 (azoxystrobin)、三氟敏 (trifloxystrobin)、百克敏 (pyraclostrobin) 及凡殺同 (famoxadone) 等。由本研究發現，10 mg a.i. L⁻¹ 有效成分濃度之亞托敏對於 3 株 *P. mangiferae* 分離株的菌絲生長抑制率均不佳，均僅有 50% 以下之抑制率，然而其確可完全抑制 3 株菌株之孢子發芽。根據 Everett *et al.* (2005) 指出，亞托敏在生體外測試對酪梨果

腐病或蒂腐病之 *C. gloeosporioides*、*Botryosphaeria dothidea*、*B. parva* 及 *Phomopsis* sp. 等病原菌其菌絲生長皆抑制效果不佳，但對其孢子發芽抑制效果好，然而實際將亞托敏施用於田間時可有效降低酪梨果腐病或蒂腐病發生；而扶吉胺 (fluazinam) 藥劑雖對上述會引起酪梨果腐病或蒂腐病之病原菌其菌絲生長及孢子發芽皆具有較佳抑制效果，但實際施用於田間其對酪梨果腐病或蒂腐病之防治效果不佳。生體外測試與田間試驗結果有差異性，可能不單純只是藥劑對病原菌菌絲生長或孢子發芽之影響，還牽涉到藥劑施用於植物葉面上或果實表面上之停留時間、藥劑對植物本身滲透移行性、或藥劑對環境因子如 UV 光之耐受性等因素之相互關係。因此，為確定本研究篩選之藥劑對 *P. mangiferae* 引起之檬果果實病害防治效果，未來仍須進一步進行田間防治測試。

綜合上述，由本研究結果顯示，由 *P. mangiferae* 引起採後病害可在檬果果實蒂頭或果身造成腐爛病斑，其感染源可能來自枯枝或落葉上產生之病原菌分生孢子，藉由風雨途徑進行侵染。因此，清除果園枯枝、落葉，可有效地減少田間之感染源密度。而在藥劑防治上，由本研究所篩選的得克利、亞托待克利、貝芬菲克利及賽普護汰寧可有效抑制 3 株菌絲生長，而亞托敏、亞托待克利及賽普護汰寧可顯著降低此病原菌之孢子發芽，於檬果開花期至套袋前應施以防治藥劑與炭疽病共同進行防治時亦可防治由 *P. mangiferae* 引起採後病害。雨季時則應加強藥劑防治，以降低田間病原菌之侵染，達到防治本病害之目的。

誌謝

本研究工作承陳幸葵小姐、吳貽文小姐、王晉鍾先生、曾添水先生及張釗明先生協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

- Ann, P. J. and H. R. Yang. 2003. Plant Protection 10-Mango Diseases. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture. Taipei. 195 pp. (in Chinese)
- Ann, P. J., L. S. Lu, T. Y. Chuang, and C. W. Kao. 1998. Effect of fruit bagging and mulching on control of mango fruit anthracnose disease. *Plant Pathol. Bull.* 7:19–26.
- Avila-Adame, C., G. Olaya, and W. Köller. 2003. Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to strobilurin-related QoI fungicides. *Plant Dis.* 87:1426–1432.
- Bhatt, H. R. and K. B. Jadeja. 2010. Mango stem end rot management with carbendazim. *Indian Phytopathol.* 63:103–105.
- Chan, W. L. 2009. Effect of Vapor Heat Treatment on Symptom Development of Anthracnose in Harvested Ripe “Irwin” Mango. Master thesis. Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University. Taipei. 88 pp. (in Chinese with English abstract)
- Chen, S. F., D. P. Morgan, J. K. Hasey, K. Anderson, and T. J. Michailides. 2014. Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English walnut in California. *Plant Dis.* 98:636–652.
- Cooke, T., D. Persley, and S. House. 2009. Diseases of Fruit Crops in Australia. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO). Canberra. 276 pp.
- de Macedo, D. M. and R. W. Barreto. 2008. First record of *Botryosphaeria ribis* associated with leaf spots on *Magnolia* aff. *Candollei* in Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 39:321–324.
- de Oliveira Costa, V. S., S. J. Michereff, R. B. Martins, C. A. T. Gava, E. S. G. Mizubuti, and M. P. S. Câmara. 2010. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. *Eur. J. Plant Pathol.* 127:509–519.
- Everett, K. R., P. S. Stevens, and J. G. M. Cutting. 1999. Postharvest fruit rots of avocado are reduced by benomyl applications during flowering. *Proceed. New Zealand Plant Protect. Soc.* 52:153–156.
- Everett, K. R., S. G. Owen, and J. G. M. Cutting. 2005. Testing efficacy of fungicides against postharvest pathogens of avocado (*Persea americana* cv. Hass). *Proceed. New Zealand Plant Protect. Soc.* 58:89–95.
- Gomes, R. R., C. Glienke, S. I. R. Videira, L. Lombard, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2013. *Diaporthe*: A genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia* 31:1–41.
- Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. *Taiwan Phytopathological Society*. Taichung. 386 pp. (in Chinese)
- Huang, S. H. 2005. Integrated control for pear disease. *Taichung Dist. Agric. Improv. Stat.* 75:305–325. (in Chinese with English abstract)

- Iram, S., H. Meer, and I. Ahmad. 2013. Major post-harvest diseases of mango and their management. *Int. J. Agron. Plant Product.* 4:3470–3484.
- Ko, Y., C. W. Liu, C. Y. Chen, S. Maruthasalam, and C. H. Lin. 2009. First report of stem-end rot of mango caused by *Phomopsis mangiferae* in Taiwan. *Plant Dis.* 93:764.
- Kraiczky, P., U. Haase, S. Gencic, S. Flindt, T. Anke, U. Brandt, and G. von Jagow. 1996. The molecular basis for the natural resistance of the cytochrome bc1, complex from strobilurin-producing basidiomycetes to center Qp inhibitors. *E. J. Biochem.* 235:54–63.
- Kumah, P., F. Appiah, and J. K. Opoku-Debrah. 2011. Effect of hot water treatment on quality and shelf-life of Keitt mango. *Agric. Biol. J. N. Amer.* 2:806–817.
- Mostert, L., P. W. Crous, J. C. Kang, and A. J. L. Phillips. 2001. Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. *Mycologia* 93:146–167.
- Ni, H. F. 2012. Study on Mango Fruit rot Caused by Botryosphaeriaceae. Doctoral thesis. Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University. Taipei. 99 pp. (in Chinese with English abstract)
- Ni, H. F., H. R. Yang, R. S. Chen, R. F. Liou, and T. H. Hung. 2012. New Botryosphaeriaceae fruit rot of mango in Taiwan: Identification and pathogenicity. *Bot. Stud.* 53:467–478.
- Pearson, R. C. and A. C. Goheen. 1988. *Compendium of Grape Diseases*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. 121 pp.
- Ploetz, R. C., G. A. Zentmyer, W. T. Nishijima, K. G. Rohrbach, and H. D. Ohr. 1994. *Compendium of Tropical Fruit Diseases*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. 118 pp.
- Punithalingam, E. 1993. *Phomopsis mangiferae*. *IMI Descriptions of Fungi and Bacteria.* 1168:1–2.
- Rosenberger, D. A. and T. J. Burr. 1982. Fruit decays of peach and apple caused by *Phomopsis mali*. *Plant Dis.* 66:1073–1075.
- Rossman, A. Y., D. F. Farr, and L. A. Castlebury. 2007. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience* 48:135–144.
- Slippers, B. and M. J. Wingfield. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: Diversity, ecology and impact. *Fungal Biol. Rev.* 21:90–106.
- Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture (TACTRI / COA). n.d. <http://www.tactri.gov.tw/wSite/htdocs/ppmtable/frle-01.pdf> (visit on 9/4/2014)
- The American Phytopathological Society (APS). 2014. Common Names of Plant Diseases. <https://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/default.aspx>. (visit on 9/15/2014)
- Thompson, S. M., Y. P. Tan, A. J. Young, S. M. Neate, E. A. Aitken, and R. G. Shivas. 2011. Stem cankers on sunflower (*Helianthus annuus*) in Australia reveal a complex of pathogenic *Diaporthe* (*Phomopsis*) species. *Persoonia* 27:80–89.
- Trakunyingcharoen, T., R. Cheewangkoon, C. To-anun, P. W. Crous, J. M. van Niekerk, and L. Lombard. 2014. *Botryosphaeriaceae* associated with diseases of mango (*Mangifera indica*). *Aust. Plant Pathol.* 43:425–438.
- Tsai, Y. P. 2003. *Plant Protection 9-Citrus Diseases*. Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture. Taipei. 378 pp. (in Chinese)
- Úrbez-Torres, J. R., F. Peduto, P. M. Vossen, W. H. Krueger, and W. D. Gubler. 2013. Olive twig and branch dieback: Etiology, incidence, and distribution in California. *Plant Dis.* 97:231–244.
- Yu, L., X. L. Chen, L. L. Gao, H. R. Chen, and Q. Huang. 2009. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing canker and shoot blight of eucalyptus in China. *Plant Dis.* 93:764.

Survey and Fungicides Screening for Mango Postharvest Disease Caused by *Phomopsis mangiferae*

Chiao-Wen Huang¹, Hong-Ren Yang², Ching-Yi Lin¹, Sui-Li Hsu³, Su-Yu Lai³,
Wen-Chi Ko³, and Hui-Fang Ni^{4,*}

Abstract

Huang, C. W., H. R. Yang, C. Y. Lin, S. L. Hsu, S. Y. Lai, W. C. Ko, and H. F. Ni. 2015. Survey and fungicides screening for mango postharvest disease caused by *Phomopsis mangiferae*. J. Taiwan Agric. Res. 64(1):21–31.

Phomopsis mangiferae is one of pathogens causing stem-end rot or fruit rot disease of mango in Taiwan. The objectives of this study were to survey and screen fungicides for mango postharvest diseases caused by *P. mangiferae*. A field survey was performed at Yujing and Guntian Townships in Tainan City during 2009–2011. The results showed this disease incidence was 51.5% in Guntian, greater than 11.9% in Yujing. The results showed that *P. mangiferae* was the major pathogen of stem-end rot or fruit rot disease of mango in Guntian Township. Moreover, three isolates of *P. mangiferae*, Ph-453, Ph-546 and Ph-550, were inoculated on immature mango fruits, and symptom of fruit rot appeared on the fruits after harvest and ripening. Pathogenicity tests indicated that all of three isolates were pathogenic to mango fruit after harvested. The ten fungicides (cyprodinil + fludioxonil, carbendazim + imazalil, iprodione, thiabendazole, carbendazim + hexaconazole, metiram, thiophanate methyl, azoxystrobin + difenoconazole, azoxystrobin and tebuconazole) were tested their efficacy on inhibiting mycelial growth and spore germination of *P. mangiferae* Ph-453, Ph-546 and Ph-550 isolates in vitro, respectively. The results showed that tebuconazole, azoxystrobin + difenoconazole, and carbendazim + hexaconazole had more than 97% of inhibition when their effective concentrations were from 10 mg a.i. L⁻¹ to 100 mg a.i. L⁻¹. cyprodinil + fludioxonil, azoxystrobin, and azoxystrobin + difenoconazole were effectively inhibited spore germination. These fungicides are currently recommended to the control of anthracnose for mango, and they could also be used to control the postharvest diseases of mango fruit caused by *P. mangiferae* in the field.

Key words: Mango (*Mangifera indica*), Post-harvest diseases, *Phomopsis mangiferae*, Fungicides screening.

Received: September 15, 2014; Accepted: November 24, 2014.

* Corresponding author, e-mail: hfni@dns.caes.gov.tw

¹ Assistant Research Fellows, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

² Research Fellow and Director, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

³ Research Assistants, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

⁴ Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.