

# 三種奧勒岡屬植物精油 應用於水稻病原真菌防治之評估<sup>1</sup>

陳環斌<sup>2</sup>、郭建志<sup>2</sup>、陳裕星<sup>2</sup>

## 摘 要

本研究主要目的在三種奧勒岡屬植物奧勒岡、日本馬約蘭及義大利馬約蘭(代號TMO、TMJ、TMI)於不同收穫期(105、120、135、150天)所萃取精油對水稻病原真菌包括紋枯病菌(*Rhizoctonia solani*, TCRS01)、小粒菌核病菌(*Nakataea irregular*, TCNI05)、秧苗立枯病菌(*Sclerotium rolfsii*, TCSR03)及胡麻葉枯病菌(*Helminthosporium oryzae*, TCHO02)之抑制效果, 並評估最佳萃取時期。分析結果發現, 測試精油濃度為0.5 ml/ml與1 ml/ml對水稻病原真菌試驗抑制效果, 除*R. solani*抗菌試驗中TMO之150天及*H. oryzae*抗菌試驗中TMI之105天等萃取精油有顯著差異外( $p < 0.01$ ), 其餘未達顯著差異; 若精油濃度降至0.1 ml/ml時, 除*H. oryzae*抗菌試驗中TMI之105天及*S. rolfsii*抗菌試驗TMO之120天等萃取精油未達顯著差異, 其餘皆有顯著差異。整體而言, 三種不同奧勒岡屬植物間(TMO、TMJ、TMI)或不同收穫期萃取之精油對抑菌效果均有顯著性差異。建議未來研發植物保護製劑、保健食品及化妝品等產業上應用, 宜針對病原菌種類選定特殊品種, 並於適當收穫期採收之萃取精油, 以獲得較佳之抑菌效果。

**關鍵詞：**奧勒岡屬、抗真菌活性、精油、水稻病原真菌。

## 前 言

臺灣位處熱帶與亞熱帶氣候地區, 常年處於高溫潮濕氣候環境下, 造成多種作物病害容易發生與傳播, 病害往往造成作物極大損失, 農民增加農藥用量防治, 危及農產品衛生安全, 也對生態環境造成極大的衝擊。近年來植物萃取液或精油抑制病蟲害應用於有機農業非農藥防治技術, 已成為國內外學者研究之重點<sup>(1,2,6,12)</sup>。在精油抑菌研究上, 本場研究人員曾利用所蒐集奧勒岡屬植物萃取精油對水稻真菌及其他細菌病害具良好抑菌效果<sup>(5)</sup>。

奧勒岡屬植物由約20幾種辛香植物所組成。其中含括知名香草作物奧勒岡 *Origanum vulgare* (L.), 英文名Oregano, 以及馬約蘭 *Origanum marjorana* (L.), 英文名Sweet Marjoram<sup>(4)</sup>。奧勒岡之萃取精油富含萜類及多酚類, 主成份有百里香酚(thymol)及香芹酚(carvacrol), 其他

<sup>1</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場研究報告第 0834 號。

<sup>2</sup> 行政院農業委員會臺中區農業改良場助理研究員。

成分還包括 $\alpha$ -terpinen (松油烯)、 $p$ -cymene (對異丙基甲苯)、terpinene-4-ol (帖烯4醇)<sup>(13)</sup>等，其中酚類被認為是抗氧化的主要成分<sup>(15)</sup>。馬約蘭精油主成分含16至52%之terpinene-4-ol，0~43%之(Z)-sabinene hydrate，3~14%之 $\alpha$ -terpineol，2~10%之 linalool等成分，是一種優良的抗菌性(包括細菌、真菌與病毒)之精油<sup>(3,4)</sup>，常被使用於食品添加或為香水開發原料。奧勒岡屬植物精油可利用於食品與蔬菜防腐保鮮劑<sup>(8,9)</sup>、抗氧化劑、保養及化妝品中添加之抑菌劑及飼料添加物<sup>(7,15)</sup>等皆屬於其應用範圍，此外，部分在醫學應用上也發現具有抑制乳癌腫瘤生長或誘導腸癌細胞凋亡。

本研究主要目的以不同奧勒岡屬植物(TMO、TMJ、TMI)於不同收穫期萃取精油對4種水稻真菌病菌孢子發芽抑制效果，並評估對前述病菌最佳萃取時期，以作為進一步研製天然植物保護製劑之基礎。

## 材料與方法

### 一、試驗材料

#### (一)三種奧勒岡植物

本試驗使用本場蒐集篩選生育良好之3種奧勒岡屬植物，本試驗植物品種包含奧勒岡 *Origanum vulgare* (L.)，英文名Oregano，代號TMO，以及馬約蘭 *Origanum marjorana* (L.)，英文名Sweet Marjoram，分別日本馬約蘭、義大利馬約蘭等二品種，代號分別為TMJ、TMI，先以扦插育苗，再移植田間栽培管理，並分別於植後105、120、135、150天，於102年2~4月間割取地上部並去除枯葉，以水蒸氣蒸餾法進行精油萃取。

#### (二)真菌接種種源之製備

取本場生物資材應用研究室提供之4種病原真菌 *Rhizoctonia solani* AG1 (TCRS01)、*Nakataea irregular* (TCNI05)、*Sclerotium rolfsii* (TCSR03)、*Helminthosporium oryzae* (TCHO02)。4種病原真菌經單胞培養馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(DifcoTM Potato Dextrose Agar，簡稱PDA)，置於28℃定溫箱培養2~3天以產生大量分生孢子，以供爾後接種試驗。

### 二、試驗方法

#### (一)精油備製

將不同處理(品種、收穫期)之奧勒岡屬植物地上部材料秤取鮮重2 kg，分別以4,000 ml之蒸餾水加熱進行蒸氣蒸餾萃取2 hr，蒸氣經由導管引入冷凝管後，以分餾瓶收集1,000 ml蒸氣冷凝液(純露)，可獲得0.1~1.7 ml之精油。抗菌試驗中精油稀釋成不同濃度時，均以Tween20 (介面活性劑)為溶劑進行稀釋為0.1及0.5 ml/ml進行抗病原真菌試驗，對照組為滅菌水。

#### (二)抗病原真菌試驗

採用以『Kirby-Bauer測試法』修改之固態平板鐵環方法評估精油對植物病原真菌活性，取馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基粉末，加入蒸餾水調成一定濃度(39 ml/l)之滅菌溶液並倒

入培養皿，在未凝固前將3個鐵環置入於中心點等距之三角點，將病原真菌接種在培養基正中心，再於鐵環中加入已調製之精油各100  $\mu$ L，放置於28 $^{\circ}$ C下培養，逐日觀察菌絲生長情形，待對照組菌絲長至鐵圈，量測各精油處理組鐵環到菌絲距離及培養基中心點至鐵環之距離，並計算抗菌指數(Antifungal index)。每處理進行3重複。

$$\text{抗菌指數(\%)} = \frac{\text{處理組鐵環到菌絲距離}}{\text{處理組培養基中心點至鐵環之距離}} \times 100$$

### 三、統計分析

變方分析(Analysis of Variance, ANOVA)：利用SAS(Statistical Analysis System)統計分析調查計算抗菌指數(%)之平均值，進行變方分析(ANOVA)如有顯著差異再進行最小顯著性測驗(Least Significant Difference, LSD)。

## 結果與討論

三種奧勒岡屬植物精油抗菌試驗結果如表一所示，不同處理之精油對*R. solani*抑菌效果達極顯著性差異( $p < 0.01$ )。當精油濃度為1 ml/ml，對於不同收穫期精油的抗菌指數皆大於82.3%；若精油使用濃度降為0.5 ml/ml及0.1 ml/ml時，其抗菌指數最低降為21.6%，以TMO於135天收穫萃取精油對抑菌孢子發芽效果最差；由上述結果顯示不同精油抑菌效果隨濃度稀釋有下降趨勢，不同品種間在不同時間收穫之精油抑菌效果中，以TMO萃取精油抑菌活性有較差之趨勢，所以當濃度稀釋至0.1 ml/ml時，抑菌指數可能降至21.6%。考慮3種奧勒岡屬植物萃取精油之最佳抑菌活性的適當收穫期及植株生育特性(直立性)，TMI及TMJ適當萃取收穫時期為105~135天左右。未來發展抗紋枯病菌天然植物保護製劑研發時，宜優先考慮TMI及TMJ。

測試植物精油對於胡麻葉枯病原菌之抑菌性試驗結果如表二，顯示不同精油濃度、不同收穫期精油及三種奧勒岡屬植物對*H. oryzae* TCHO02抑菌效果達顯著性差異( $p < 0.01$ )。以精油使用濃度1 ml/ml而言，除了TMI收穫期105天對TCHO02抗菌指數為67.6%，且抑制菌絲發芽效果較差，其餘大部分測試精油可完全抑制菌絲發芽；在相同奧勒岡屬植物及相同收穫期之精油，當其濃度為0.5 ml/ml與1 ml/ml時對TCHO02抗菌指數，大部分未達顯著差異。若測試精油濃度降為0.1 ml/ml時對TCHO02抗菌活性有顯著下降趨勢。另外，考慮經濟產量因素，3種奧勒岡屬植物較佳抑菌活性(50%)之收穫期評估，TMO為105天、TMJ為120天、TMI在105天。

表一、三種奧勒岡屬植物於不同收穫期精油對水稻紋枯病菌之抗菌指數(%)

Table 1. Antifungal index (%) of various concentrations of essential oil from three Oregano plants harvest on the different period against *R. solani* TCRS01

Harvest period (day)	Variety	Concentration (ml/ml)		
		0.1	0.5	1
105	TMI	63.6 <sup>1</sup>	100.0	100.0
	TMJ	62.0	100.0	100.0
	TMO	85.6	97.6	100.0
120	TMI	71.0	100.0	100.0
	TMJ	69.0	100.0	100.0
	TMO	67.3	100.0	100.0
135	TMI	44.0	100.0	100.0
	TMJ	49.6	96.6	100.0
	TMO	21.6	61.3	82.3
150	TMI	50.6	100.0	100.0
	TMJ	39.6	100.0	100.0
	TMO	33.0	74.6	94.0

<sup>1</sup> Each value represents the mean of three replications. Significantly different by Least Significant Difference Test at 1% level is equal to 12.3.

表二、三種奧勒岡屬植物不同收穫期精油對胡麻葉枯病菌之抗菌指數(%)

Table 2. Antifungal index (%) of various concentrations of essential oil from three different Oregano plants harvest on the different period against *H. oryzae* TCHO02

Harvest period (day)	Variety	Concentration (ml/ml)		
		0.1	0.5	1
105	TMI	98.6 <sup>1</sup>	97.3	67.6
	TMJ	49.0	95.3	100.0
	TMO	67.3	90.0	91.3
120	TMI	49.0	95.3	98.6
	TMJ	47.3	98.0	100.0
	TMO	72.0	90.3	98.0
135	TMI	52.0	100.0	100.0
	TMJ	27.0	100.0	100.0
	TMO	72.6	87.6	95.6
150	TMI	56.3	100.0	100.0
	TMJ	27.6	100.0	100.0
	TMO	60.3	92.3	96.6

<sup>1</sup> Each value represents the mean of three replications. Significantly different by Least Significant Difference Test at 1% level is equal to 9.6.

表三為奧勒岡植物精油對水稻真菌性秧苗立枯原菌之抑菌試驗，顯示不同處理之精油對 *S. rolfsii* TCSR03 抑制效果達極顯著性差異 ( $p < 0.01$ )。以濃度 1 ml/ml 之測試精油而言，以 TMO 在 105、135 及 150 天萃取精油對該病原菌之抑菌效果較差，其餘測試精油皆具有完全抑菌性。當測試精油濃度降為 0.5 ml/ml 時，與精油濃度 1 ml/ml 相較，各測試精油在濃度間對抗菌指數並無顯著差異，意味精油濃度 0.5 ml/ml 與 1 ml/ml 抑制菌絲發芽效果相同。若精油濃度為 0.1 ml/ml 時對該病原菌之抑菌效果較差或完全無抑菌效果 (1.6、3.3)。此外，對於 3 種奧勒岡屬植物間對 TCSR03 抑制孢子發芽效果評估，以 TMI 及 TMJ 抑菌性較 TMO 為佳。所以，對 TCSR03 抑制菌絲發芽效果之較適品種及收穫天數而言，以 TMI 在 120 天收穫之萃取精油較具開發潛力。

表三、三種奧勒岡屬植物不同收穫期精油對秧苗立枯病菌之抗菌指數 (%)

Table 3. Antifungal index (%) of various concentrations of essential oil from three Oregano plants harvest on the different period against *S. rolfsii* TCSR03

Harvest period (day)	Variety	Concentration (ml/ml)		
		0.1.0	0.5	1.
105	TMI	65.0 <sup>1</sup>	95.6	100.0
	TMJ	47.3	100.0	100.0
	TMO	53.3	86.6	84.6
120	TMI	46.0	100.0	100.0
	TMJ	28.0	100.0	100.0
	TMO	91.0	90.3	100.0
135	TMI	21.3	100.0	100.0
	TMJ	1.6	100.0	100.0
	TMO	13.3	50.6	62.0
150	TMI	7.6	98.0	100.0
	TMJ	3.3	100.0	100.0
	TMO	4.6	60.3	70.3

<sup>1</sup> Each value represents the mean of three replications. Significantly different by Least Significant Difference Test at 1% level is equal to 14.5.

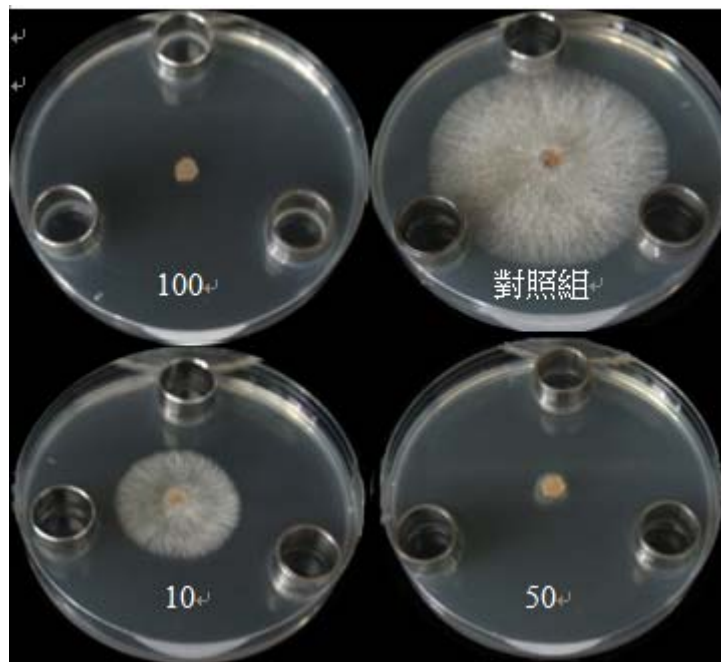
針對小粒菌核病菌之抑菌性 (表四) 結果顯示，與表一~表三有相似之結果，測試精油濃度為 0.5 ml/ml 與 1 ml/ml 對 *N. irregular* TCNI05 抗菌指數，有完全抗菌效果，且二者沒有達顯著差異 ( $p < 0.01$ )。當測試精油濃度降為 0.1 ml/ml 時，抑菌效果由完全抗菌降至 26.3~87% (圖一)，亦隨品種間差異而變。另在同品種之下，不同收穫期之測試精油差異 TMI 及 TMO 稍有不同，唯 TMJ 不同時期萃取精油對 TCNI05 抑菌指數無顯著差異性。整體而言，3 種奧勒岡屬植物萃取精油對抑制 TCNI05 菌絲發芽之最佳採收時期，TMO 以 105 天或 120 天最佳，TMI 以 135 天產量高且抑菌率佳，TMJ 則不隨採收時間的不同而變化。

表四、三種奧勒岡屬植物不同收穫期精油對小粒菌核病菌之抗菌指數(%)

Table 4. Antifungal index (%) of various concentrations of essential oil from three Oregano plants harvest on the different period against *N. irregular* TCNI05

Harvest period (day)	Variety	Concentration (ml/ml)		
		0.1	0.5	1.
105	TMI	57.3 <sup>1</sup>	100.0	100.0
	TMJ	26.3	100.0	100.0
	TMO	87.0	100.0	100.0
120	TMI	42.0	100.0	100.0
	TMJ	30.6	100.0	100.0
	TMO	76.0	100.0	100.0
135	TMI	60.3	100.0	100.0
	TMJ	30.3	100.0	100.0
	TMO	55.3	95.0	100.0
150	TMI	43.0	100.0	100.0
	TMJ	30.0	100.0	100.0
	TMO	78.3	96.3	100.0

<sup>1</sup> Each value represents the mean of three replications. Significantly different by Least Significant Difference Test at 1% level is equal to 11.61.

圖一、奧勒岡屬植物 TMO 萃取精油對水稻病原真菌 *N. irregular* 菌絲之抑制效果。Fig. 1. Inhibitory effects of essential oil from the Oregano plant "TMO" against *N. irregular* TCNI05.

固態平板鐵環試驗利用馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基，在未凝固前將3個鐵環置入於中心點等距之三角點，將病原真菌接種在培養基正中心，再於鐵環中加入已調製之精油，且其擴散愈遠，濃度愈低，倘其抑菌有效，則接種位置四周立即形成一環抑制圈(Zone of inhibition)，並藉此抑制圈的半徑測量，可以評估抗菌性。其方法優點為技術簡單、不須特殊設備，其結果易於分析。

由試驗結果統計分析顯示，當測試精油使用濃度100%時，3種奧勒岡屬品種在不同採收時期萃取精油對*R. solani*、*N. irregular*、*S. rolfsii*及*H. oryzae*的抗菌指數達100%，皆具有良好的抑菌活性。當精油濃度稀釋50%時與精油濃度100%相較下，對於上述水稻真菌抑菌效果而言，除TMO在135天萃取之精油對*R. solani*有顯著性差異，其餘測試精油抗菌效果無顯著差異。當測試精油稀釋為10%與100%相較之下，對前述不同菌種之抗菌效果皆達顯著性差異，另與測試精油稀釋50%比較則可能因不同品種及不同收穫期呈現不同顯著差異性。

進一步截取平板上無菌絲之PDA，置於空白組之PDA中心，結果顯示長滿菌絲(資料未呈現)，這顯示精油成分中含有抑制孢子發芽物質並無法殺死病菌，這可能是植物萃取液或精油成分對數種真菌均具有抑制發芽或靜菌作用<sup>(5,10)</sup>。有些學者發現植物萃取液或精油可誘導植物系統抗菌能力，此類為植物體產生抗菌物質—植物防禦素(Phytoalexin)有關，例如酚類化合物<sup>(11,14)</sup>、過氧化酵素及幾丁質分解酵素等<sup>(16)</sup>。

綜合上述結果，當測試精油濃度差異對水稻病原真菌試驗顯示，測試精油濃度降為0.5 ml/ml與1 ml/ml時，對水稻病原真菌抗菌指數，除*R. solani*抗菌試驗中TMO在150天及*H. oryzae*抗菌試驗中TMI在105天等萃取之精油有顯著差異外( $p < 0.01$ )，其餘未達顯著差異；若精油濃度降至0.1 ml/ml時，除*H. oryzae*抗菌試驗中TMI在105天及*S. rolfsii*抗菌試驗TMO在120天等萃取之精油未達顯著差異，其餘皆有顯著差異，可能是不同收穫期萃取精油主要抗菌成分差異造成，故推測原因可能是品種與生長條件不同所造成<sup>(17)</sup>。另當抗菌物質稀釋至最小抑菌濃度(minimum inhibitory concentration)，易造成不同濃度之抗菌指數有顯著差異。

## 結 論

比較測試精油濃度為100%與50%對水稻病原真菌試驗抑制效果，除*R. solani*抗菌試驗中TMO之135天後採收萃取精油及*H. oryzae*抗菌試驗中TMI之105天、TMO之135天等萃取精油有顯著差異外( $p < 0.01$ )，其餘未達顯著差異；若與精油濃度稀釋10%時，除*H. oryzae*抗菌試驗中TMI之105天及*S. rolfsii*抗菌試驗TMO之120天等萃取精油未達顯著差異，其餘皆有顯著差異。整體而言，三種不同奧勒岡屬植物間(TMO、TMJ、TMI)或不同收穫期萃取之精油對抑菌效果均有顯著性差異，所以未來在相關天然植物保護製劑開發上，宜依不同菌種下選取不同生育期之植物精油並測試其最小抑菌濃度(minimum inhibitory concentration)，以獲得較具經濟性之抗菌效果。

## 致 謝

本研究承行政院農業委員會101農科-9.2.1-中-D4計畫補助，臺中區農業改良場特作雜糧研究室林炫如與黃美紅小姐協助試驗，俾使本研究能順利完成，特申謝忱。

## 參考文獻

1. 何婉清、李惠玲、李智緯、吳宗諭、李興進 2002 抑菌植物材料的篩選 植保會刊 44: 365。
2. 胡敏夫、謝廷芳、許秀惠、余志儒、黃晉興、柯文雄 2004 植物萃取液對植物病原菌之抑制及棉蚜之忌避 p159-174 果菜健康管理研討會。
3. 張隆仁 2003 馬約蘭—山中的愉悅(Joy of the Mountain) 臺中區農業專訊 43: 14-15。
4. 張隆仁 2004 山野中令人愉悅歡樂的香藥草植物 馬約蘭 豐年半月刊 54(20): 36-38。
5. 秦昊宸、郭建志、劉凱翔、陳裕星 2011 臺灣地區栽培奧勒岡屬植物純露及精油之抑菌效果初探 臺中區農業改良場研究彙報 110: 71-80。
6. 謝慶芳 1999 天然藥劑與病害控制 興大農業 30: 14-17。
7. Barros, J. C., M. L. Conceicao, N. J. Gomes, A. C. V. Costa, J. P. Siqueira, I. D. Basilio and E. L. Souza. 2009. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. LWT-Food Science and Technology 42(6): 1139-1143.
8. Carmo, E. S., E. O. Lima and E. L. Souza. 2008. The potential of *Origanum vulgare* L.(Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. Brazilian Journal of Microbiology 39(2): 362-367.
9. Cleff, M.B., A. R. Meinerz, M. Xavier, L. F. Schuch, M. C. A. Meireles, M. R. A. Rodrigues and J. R. B. Mello. 2010. In vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. Brazilian Journal of Microbiology 41(1): 116-123.
10. Coventry E. and E. J. Allan. 2001. Microbiological and chemical analysis of Neem (*Azadirachta indica*) extracts: New data on antimicrobial activity, Phytoparasitica 29: 441-450.
11. Daayf, F., A. Schmitt and R. R. Belanger. 1995. The effects of plant extracts of Reynoutria sachalinensis on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber. Plant Disease 79: 577-580.
12. Ko, W. H., S. Y. Wang, T. F. Hsieh and P. J. Ann. 2003. Effects of sunflower oil on tomato powdery mildew caused by *Oidium neolycopersici*. Journal of Phytopathology 151: 144-148.
13. Ozkalp, B., F. Sevgi, M. Ozcan and M. M. Ozcan. 2010. The antibacterial activity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.). Journal of Food, Agriculture & Environment 8(2): 272-274.



14. Paul, P. K. and P. D. Sharma. 2002. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in barley against leaf stripe disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 61: 3-31.
15. Radusiene, J., L. Ivanauskas, V. Janulis and V. Jakstas. 2010. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Origanum vulgare*. *Acta Horticulturae* 860: 93-96.
16. Ribnicky, D. M., I. Chet, D. Frisem, A. Poulev, I. Raskin and I. Yedidya. 2001. Extract of *Gaultheria procumbens* L. promotes disease resistance in *Cucumis sativus* challenged with *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans*. *Annual Meeting of the American Plant Biologist* 7: 21-25.
17. Yatagai, M., H. Makihara and K. Oba. 2002. Volatile components of Japanese cedar cultivars as repellents related to resistance to *Cryptomeria* bark borer. *Journal of Wood Science* 48: 51-55.

## Evaluation of Essential Oil Prepared from Oregano Plants Against the Rice Fungi Pathogens<sup>1</sup>

Whan-Bin Chen<sup>2</sup>, Chien-Chih Kuo<sup>2</sup> and Yu-Hsin Chen<sup>2</sup>

### ABSTRACT

The purpose of this experiment is to investigate antifungal activity of essential oil prepared from three variety of the genus *Origanum* (TMO, TMJ, TMI) harvest on the different period (105, 120, 135 and 150 days). The rice fungi pathogens tested included: *Rhizoctonia solani* (TCRS01), *Nakataea irregular* (TCNI05), *Sclerotium rolfsii* (TCSR03) and *Helminthosporium oryzae* (TCHO02). The results showed that most antifungal indices did not differ between 0.5 and 1.0 ml/ml of essential oil treatments, except 2 treatments, the TMO harvested on 150 days against *R. solani* and TMI harvested on 105 days against *H. oryzae* were less effective ( $p < 0.01$ ). When essential oils was reduced to 0.1 ml/ml, antifungal effects varied significantly ( $p < 0.01$ ), except TMI harvest on 105 days against *H. oryzae* and TMO harvest on 120 days against *S. rolfsii*. In conclusion, the inhibitory effects of essential oils extracted from different harvest periods of the 3 different Oreganum species were significant different. For the anti-pathogen effects of essential oils to be used in health food and cosmetic industry, more research is needed. It is important to put an emphasis that essential oils extracted from different species at different harvest time can result in different antifungal activities against different pathogens.

**Key words:** *Origanum*, antifungal activity, essential oil, rice fungi pathogens.

---

<sup>1</sup> Contribution No. 0834 from Taichung DARES, COA.

<sup>2</sup> Assistant Researcher of Taichung DARES, COA.