

生物農藥之新進展

高穗生¹ 謝奉家

摘 要

生物農藥被認為是綠色農業有害生物管理上，不可或缺的組成分。由於現代生物技術之廣泛應用，更為生物農藥之研發，開啓一個嶄新的視野。本文參閱近日國內外生物農藥領域發表之論著，簡要地綜述生物農藥的新進展，包括多功能蘇力菌之開發、新型微生物蛋白質製劑、兼具殺蟲殺菌殺線蟲功能的異小桿線蟲共生細菌—光桿菌及白殭菌植物內生定殖和植物病蟲害防治，就教於各位先進。

關鍵詞：多功能蘇力菌、新型微生物蛋白製劑、光桿菌、白殭菌。

多功能蘇力菌 (Polyvalent *Bacillus thuringiensis*)

蘇力菌 (*B. thuringiensis*) 除了會產生內毒素也就是殺蟲結晶蛋白質 (δ -endotoxin or insecticidal crystal protein, ICP) 而具有殺蟲效果，並調製成產品上市外，還具有許多其他的功能，包括具有殺蟲效果的營養期殺蟲蛋白 (vegetative insecticidal protein, Vip)，本身具有抑菌效果尚能提升殺蟲結晶蛋白之殺蟲效果的雙效菌素 (zwittermicin A) 及幾丁質酶 (chitinase)，此外，酰基高絲氨酸內酯酶 (acyl-homoserine lactonase, AHL-lactonase) 與細菌素 (bacteriocin) 及庫斯塔基肽 (kurstakins) 亦具有殺細菌之效果。上述之活性物質，值得進一步開發成兼具殺蟲抑菌功能的蘇力菌產品。

一、營養期殺蟲蛋白 (Vip)

另外一種在蘇力菌和仙人掌桿菌中曾被描述的殺蟲蛋白質稱之為營養期殺蟲蛋白 (vegetative insecticidal protein) 或 Vips，在對數生長期 (log phase) 大量表達，為可溶性胞外蛋白，與蘇力菌之 Cry 或 Cyt 毒素並無相似性 (Nunez-Valdez ; 1997)。目前 Vip 相關的序列分為 3 個不同的類別 Vip1, Vip2 和 Vip3。根據 2007 年蘇力菌

¹ 農業藥物毒物試驗所生物藥劑組 台中縣霧峰鄉舊正村光明路 11 號
論文聯繫人 E-mail: sskao@tactri.gov.tw

命名委員會之報告，這些蛋白可分三個階層 (Class) Vip1, Vip2 和 Vip3, 8 個亞階 (subclass), Vip1A, VipB, Vip1C 和 Vip1D, Vip2A, Vip2B, Vip3A 及 Vip3B, 共 54 種 Vip 蛋白 (Crickmore *et al.*, 2007)。Vip1 和 Vip2 蛋白為二元毒素 (binary toxin) 之組合成分，對鞘翅目昆蟲有殺蟲效果。Vip1Aal 和 Vip2Aal 對玉米根蟲尤其是玉米根葉甲蟲 (*Diabrotica virgifera*) 及長角葉甲蟲 (*D. longicornis*) 活性很強 (Han *et al.*, 1999; Warren, 1997)。Vip3 蛋白有不同殺蟲範圍，包括數種主要的鱗翅目害蟲。對小地老虎 (*Agrotis ipsilon*)，草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)，甜菜夜蛾 (*S. exigua*)，菸芽夜蛾 (*Heliothis virescens*)，玉米穗蟲 (*Helioverpa zea*) 及歐洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 均有殺蟲活性 (Estruch *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1997)。Vip3A 其 88 kDa 之全長毒素，被胰蛋白酶降解至 62kDa，再和中腸表皮之 80kDa 和 100kDa 之膜蛋白結合 (Lee *et al.*, 2003)。先前認為殺蟲之作用模式為自戕 (apoptosis)，但近來認為和殺蟲結晶蛋白毒素相似，活化之 Vip3A 毒素為孔洞形成 (pore-forming) 蛋白，能夠在膜上成安定的電子通道 (ion channels) (Lee *et al.*, 2003)。營養期蛋白對不同害蟲之不同作用模式亦曾被描述 (Selvapandiyan *et al.*, 2001)。由於作用模式和殺蟲結晶蛋白有所不同，營養期蛋白可以作為蘇力菌抗藥性管理策略之最佳候選者。可以利用基因之堆砌 (stacking) 或輪用，彰顯其功能。Vip 基因在植物上已有安定表現 (stable expression)，已開發出轉殖玉米品系表現之 plant-optimized Vip3Aal 基因，且對數種主要害蟲表現毒性 (Estruch *et al.*, 1998)。另外，表現 Vip3A 基因之轉殖棉花品種 (Cot102) 亦被開發出來 (EPA 2003)。繼續找尋新穎的營養期殺蟲蛋白基因 (Vip) 序列，有助於未來殺蟲之基因轉植物有較廣的殺蟲範圍，同時和作用不相同的殺蟲結晶蛋白協同進行抗藥性管理 (Rang *et al.*, 2005)。

二、雙效菌素 (Zwittermicin A)

Handelsman *et al.* (1990) 從苜蓿根際分離到一株苜蓿猝倒病 (病原為苜蓿疫病 *Phytophthora medicaginis*) 防治效果高達 100% 之仙人掌桿菌 (*Bacillus cereus* UW85)。當 UW85 芽孢大量形成時，培養液及濾液可防治苜蓿猝倒病，尚可抑制苜蓿疫病菌的生長 (Silo-suh *et al.*, 1994; Handelsman *et al.*, 1990)。先前之研究亦指出某些蘇力菌 (*B. thuringiensis*) 品系能產生加強蘇力菌活性的物質。而與仙人掌菌品系產生之抗生物質雙效菌素 (Zwittermicin A)，恰巧結構相似 (Manker *et al.*, 1994)。雙效菌素是一種線性氨基多元醇 (linear aminopolyol) 分子量 396 Da，有一個富含氮的末端，羥基交錯的排列在碳主鏈之兩側，pH7.0 時為陽離子，具熱穩定性，有抗紫外線能力。雙效菌素能抑制革蘭氏陽性和陰性的細菌，以及子囊菌和擔子菌綱等真菌之生長 (He *et al.*, 1994; Silo-suh *et al.*, 1998)。更有報告顯示其對疫病屬 (*Phytophthora* sp.)，腐霉病屬 (*Pythium* sp.) 及絲囊霉屬 (*Aphanomyces* sp.)，等之

植物病原菌有較高的抑制效果 (Osburn *et al.*, 1995; Silo-suh *et al.*, 1998; Shao *et al.* 2005)。雙效菌素並無殺蟲活性，但與蘇力菌共同使用時，能大幅提高蘇力菌毒蛋白的殺蟲活性，是一種有效的協力劑，可減少蘇力菌的使用量，減少或延遲抗藥性的產生，甚至可以拓寬蘇力菌的殺蟲範圍 (Broderick *et al.*, 2000)。

三、幾丁質酶 (chitinase)

幾丁質酶是最早從蘇力菌中發現的可溶性胞外蛋白質類殺蟲的活性物質。但是，單獨作用時，對昆蟲的殺蟲效果不高。報告證實添加商品化的幾丁質酶，源自環狀芽孢桿菌 (*B. circulans*) 之粗幾丁質製備物，或源自昆蟲腸道之幾丁質分解細菌 (chitolytic bacteria)，均能加強蘇力菌的殺蟲活性。Regev 等人 (1996) 報導，源自黏質沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 之幾丁質酶 A 在大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 表現後，此重組酵素對蘇力菌基因重組株 (*B. thuringiensis* δ -endotoxin Cry1C) 之殺蓮紋夜蛾 (*Spodoptera littoralis*) 幼蟲具協力作用。Barboza-Corona 等人 (1999) 指出同一株蘇力菌同時含有殺蟲結晶蛋白及幾丁質酶，對殺蟲活性具協力作用。至於幾丁質酶能夠增強蘇力菌的殺蟲效果，其機制尚不明確。但有研究人員認為增加中腸內切幾丁質酶 (endochitinase) 會導致圍食膜 (peritrophic membrane) 之穿孔，增加 δ -內毒素分子進入表皮膜 (epithelial membrane)，因而提升殺蟲之效果 (Regev, *et al.*, 1996)。

事實上，蘇力菌幾丁質酶之潛力尚可延伸到植物病原真菌的防治上。蘇力菌以色列亞種之幾丁質酶可抑制許多植病原真菌的生長，如對大豆種子白絹病 (*Sclerotium rolfsii*) 有 100% 抑制效果，對土麴黴 (*Aspergillus terreus*)、黃麴黴 (*A. flavus*)、黑孢屬 (*Nigrospora* sp.)、根霉屬 (*Rhizopus* sp.)、黑麴黴 (*A. niger*)、镰孢菌屬 (*Fusarium* sp.)、亮白麴黴 (*A. candidus*)、犁頭霉屬 (*Absidia* sp.)、和長蠕孢屬 (*Helminthosporium* sp.) 有 55% 至 82% 之抑菌效果，對彎孢霉屬 (*Curvularia* sp.) 有 45%，對煙麴黴 (*A. fumigatus*) 則有 10% 之抑菌效果。當大豆種子以白絹病感染，其發芽率可由 93% 下降到 25%；當加入幾丁質酶 (0.8U/mg protein)，可使發芽率上升到 90%。蘇力菌之幾丁質酶有助於大豆種子白絹病和其他植物病原真菌之生物防治 (Reyes-Ramirez, *et al.*, 2004)。

四、酰基高絲氨酸內酯酶 (acyl-homoserine lactonase, AHL-lactonase)

蘇力菌可經由一種新形式的微生物拮抗即訊息干擾 (signal interference) 來抑制植物病原菌蔬菜軟腐菌 (*Erwinia carotovora*) 之 quorum-sensing dependent 之毒力 (virulence)。蔬菜軟腐菌能產生酰基高絲氨酸內酯 (acyl-homoserine lactone) 之

quorum-sensing 訊息，並與之反應，來調節該細菌抗生素之產生和毒力基因之表現，而蘇力菌卻擁有酰基高絲氨酸內酯酶（AHL-lactonase），這是一種強力之酰基高絲氨酸內酯之降解酵素。蘇力菌不會干擾蔬菜軟腐菌之正常生長，但會破壞酰基高絲氨酸內酯訊息之累積，也會抑制蔬菜軟腐菌之毒力。蘇力菌能明顯地降低蔬菜軟腐菌在馬鈴薯上感染之流行率（incidence）和病徵之發展。研究指出蘇力菌之生物防治效力和其產生酰基高絲氨酸內酯酶之能力有關（Dong, *et al.*, 2004）。

五、細菌素 (bacteriocin)

多數已知細菌素產生菌，是來自土壤或食物的芽孢桿菌分離株。蘇力菌 HD2 合成 HD2，分子量 950 kDa (Favret and Yousten, 1989)；蘇力菌 BMG17 產生 thuricin 7，分子量 11.6kDa (Cherif, *et al.*, 2001)；蘇力菌勵木亞種 (*Bt tochiensis*, HD868)，產生 tochicin，分子量 10.5kDa (Paik, *et al.*, 1997)；蘇力菌 B439 產生 thuricin 439A 和 439B，其分子量均少於 3 kDa，二者相差 100Da (Ahern, *et al.*, 2003)；蘇力菌庫斯塔基亞種 (*Bt kurstaki*, BUPM4) 產生 bacthuricin F4，分子量 3.16kDa (Kamoun, *et al.*, 2005)；蘇力菌 NEB17 產生 thuricin 17，分子量 3.16kDa (Gray, *et al.*, 2006)；蘇力菌殺蟲亞種 (*Bt entomocidus* HD9) 產生 entomocin 9，分子量 12.4kDa (Cherif, *et al.*, 2003)；蘇力菌殺蟲亞種 (*Bt entomocidus* HD110) 產生 entomocin 110，分子量 4.8kDa (Cherif, *et al.*, 2006)。這些細菌素均具殺細菌之效果 (bactericidal)。

六、庫斯塔基胥肽 (kurstakins)

自 *B.t. Kurstaki*. HD-1 可分離出 4 種脂胥肽，對葡萄穗黴菌 (*Stachybotrys charatim*) 有抑菌效果，(Hathout *et al.* 2000)。

新型微生物蛋白製劑 (Microbial protein pesticide)

新型微生物蛋白製劑主要是蛋白質激發子類 (protein elicitor) 之物質，其不直接滅病蟲害，而是激發植物本身抗病防蟲的基因表達，並促進植物生長。其中較具代表性的有過敏蛋白 (harpin)，隱地蛋白 (cryptogin) 及激活蛋白 (activator)。

一、過敏蛋白 (harpin) (Jones, 2001)

某些植物病原菌能產生過敏蛋白，由康乃爾大學的魏忠民等人 (1992) 發現，為酸性，熱安定，富甘胺酸 (glycine)，細胞外蛋白 (extracellular protein) 由 403 個氨基組成 (無胞嘧啶核苷, cysteine)，其分子量為 40kDa，是由解澱粉軟腐菌 (*Erwinia*

amylovora) 產生，能引起植物產生過敏反應的蛋白質。美國 EDEN Bioscience，進一步研究此過敏蛋白，並開發成商品化的產品 Messenger®，並於 2000 年取得美國環保署的核准，定位為生化製劑。當過敏蛋白施用到植物上，活化植物自然生長和防禦系統。能和植物之接受器 (receptor) 結合，開始一系列複雜的訊息傳送途徑 (signaling pathway)：活化系統獲得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 基因，誘發茉莉酸/乙烯 (jasmonic acid / ethylene) 依變 (dependent) 途徑，激發植物生長有關的系統。這些反應能保護植物，使多種作物不受許多有害生物之為害，同使更能促進生長，作物產量和品質。包括小麥、稻米、柑桔、青椒和瓜類作物田間試驗的反應，顯示過敏蛋白有能力促進生長是由於下列一種或數種原因：(1)增加光合作用；(2)增加養分吸收；(3)增加生物量；(4)增加根部發展；(5)增加種子發芽；(6)提早開花；(7)改善果實發育；(8)提早果實成熟。

通常施用後 3-5 天就有全部的反應。因作物不同，效果會延續數週或整個生長期，研究並指出對許多經濟重要作物如棉花、小麥、胡瓜、柑桔、菸草、草莓、番茄和青椒均有效。並對目前無化學藥劑可防治的植物病毒，能有效的防治。顯著的例子包括番茄和青椒的菸草與胡瓜嵌紋病毒；菸草的菸草嵌紋病毒以及青椒的甜菜捲頂病毒 (curly-top virus)。Messenger®處理的番茄植物亦表現減少結癭 (galling)；對根瘤線蟲具耐受性 (tolerance)，或且可增加販售果實的大小和等級之現象。Messenger®處理之菸草尚對囊胞線蟲 (cyst nematode) 具耐受性。還可有效的管理番茄、胡瓜、草莓和小麥等之土壤病害如镰孢菌 (*Fusarium* spp.)。過敏蛋白並不會殺死害蟲和病原菌，因此不會造成選汰壓力，不會使有害生物產生抗藥性，適合於防治對化學藥劑產生抗性之有害生物。

二、隱地蛋白 (cryptogein)

疫病菌屬 (*Phytophthora* spp.) 除了菸草疫病 (*P. nicotianae*) 外，會誘發其非寄主植物菸草產生類過敏性壞死 (hypersensitive-like necroses)。除了菸草疫病外，這些疫病菌之培養液會分泌一種蛋白，稱之為激發子，會造成菸草之葉部壞死，和二者之間的不親和反應 (incompatible reaction) 有關。因而，激發子能使菸草免於菸草疫病之攻擊。隱地蛋白是由隱地疫病 (*P. cryptogea*) 所分泌，已被純化，解序和特性化，並訂名為一種激發素 (elicitin)，是一種具 10kDa 分子量全蛋白 (holoprotein) 的新穎科 (novel family) (Terce-Laforgue, *et al.*, 1992)。隱地蛋白在極低濃度下就可誘導菸草產生過敏性反應，並使植株獲較大範圍的抗病性，同時會產生與防禦性反應相關的物質如乙烯、植物保衛素 (phytoalexin)、發病機制相關蛋白 (pathogenesis-related proteins) 等 (Milat, *et al.*, 1991)。Zhang *et al.* (1999) 從棕櫚疫病 (*P. palmivora*) 的培養中分離出分子量為 10.6kDa 的不含糖基的耐熱蛋白，

這種蛋白能誘導菸草葉片產生過敏性壞死，根據推測此 10.kDa 之蛋白亦屬於激發素類的激發子。

三、激活蛋白 (activator) (Qiu 2004, 2006)

從鏈格孢屬 (*Alternaria* spp.)、立枯絲核菌 (*Rhizoctonia solani*)、麴菌 (*Aspergillus* spp.)、灰黴菌 (*Botrytis* spp.)、稻熱病 (*Piricularia oryzae*)、青黴菌 (*Penicillium* spp.)、木黴菌 (*Trichoderma* spp.) 和镰胞菌 (*Fusarium* spp) 等多種真菌中篩選分離純化出一種新型蛋白。胺基酸和核苷酸序列分析顯示，此種蛋白不同於過敏蛋白和隱地蛋白 (Qiu 2004, 2006)。根據其作用機制，將此蛋白命名為激活蛋白 (activator)。該蛋白不誘導菸草植株的過敏反應，與過敏蛋白和激發素均對菸草產生過敏反應不同。其對菸草花葉病毒、黃瓜花葉病毒及蚜蟲之控制效果超過 75%。並能促進生產。激活蛋白通過激活植物體內分子免疫系統，能提高植物自身之免疫力；經過激發植物體內一系列代謝之調控，促進植物根莖葉的生長和葉綠素含量提高，因而達到提高作物的目的。

具殺蟲、殺菌及殺線蟲功能的光桿菌

光桿菌 (*Photobacterium luminescens*) 屬於腸內桿菌科 (Enterobacteriaceae)，為革蘭氏陰性，可發出冷光 (bioluminescent) 的桿菌細菌，可與嗜菌異小桿線蟲 (*Heterorhabdits bacteriophora*) 共生，光桿菌屬 1993 年才正式從異桿菌屬 (*Xenorhabdus* spp.) 中分出 (Boemare *et al.*, 1993)。筆者實驗室在 2004 年開始參與行政院農業委員會農業生物技術國家型計畫，利用大蠟蛾誘餌法 (*Galleria*-bait) 進行台灣本土異小桿線蟲蒐集，2005 年首度篩獲本土異小桿線蟲—短尾異小桿線蟲，並已累計篩獲 6 隻台灣本土異小桿線蟲—短尾異小桿線蟲。由於短尾異小桿線蟲與光桿菌共生，所以接著自線蟲體內採集、分離與篩選光桿菌菌株，已有 15 株共生細菌已經依細菌的形態、生化試驗與 16 S rRNA 等方法，確認為本土光桿菌菌株 (*P. luminescens* subsp. *akhurstii*)。(Hsieh *et al.* 2005. Hsieh *et al.* 2007)

一、殺蟲毒蛋白

目前已分離到 3 個具有不同程度殺蟲活性的光桿菌亞種 (Forst *et al.*, 1997; Fischer-Le Saux *et al.*, 1999; French-Constant *et al.*, 2003; 謝等; 2005)。美國 Wisconsin 大學的科學家從寄生在嗜菌異小桿線蟲消化道內的一種光桿菌中找到一個蛋白複合物，它由 A、B、C、D 種成份組成 (Bowen *et al.*, 1998)，這種蛋白複合物除了對鱗翅目具有殺蟲活性外，鞘翅目和雙翅目也都有很強的毒殺活性，是一種

廣譜殺蟲基因，這些發現可能產生出新的防治蟲害方法。例如可經量產純化直接噴灑這種細菌的毒素，以防治害蟲，或者是將它們的基因選殖到植物中去，這種新基因對於農作物持久性抗蟲育種具有很大的應用潛力。在 1998 年公開的一項專利 (Ensign 1998) 和隨後發表的幾篇論文中 (Bowen and Ensign, 1998 ; Bowen *et al.*, 1998; Blackburn, 1998)，光桿菌菌株 W-14 中的毒蛋白複合基因已利用基因剔除 (genetic knock-out) 方式，初步發現含四個編碼毒蛋白複合體 (toxin complex, tc) 的基因簇 *tca* (13kb), *tcb* (7.5kb), *tcc* (11.5kb) 和 *tcd* (12kb)，其中 *tca* 和 *tcd* 編碼的高分子量蛋白複合體 a (complex a) 和蛋白複合體 d (complex d) 煙草天蛾 (*Manduca sexta*) 等害蟲有較強的口服毒性 (oral toxicity)。光桿菌毒蛋白複合體為外分泌型，分子量大於 100kDa，其活性作用部位位於害蟲中腸。Ragni 等在 1998 年公開的另一項專利中則報導光桿菌 XP01 的殺蟲活性成分為非外分泌型物質，將上述殺蟲蛋白基因轉入大腸桿菌後，可用抗體檢出表現蛋白，但未顯示出口服毒性，據分析可能是表現蛋白未加工修飾成活性蛋白和未分泌至胞外所致。光桿菌殺蟲毒蛋白的基因簇 (genomic islands) 較大，遺傳操作較難 (Waterfield *et al.*, 2002; Ffrench-Constant *et al.*, 2003)。研究人員陸續發現其它與殺蟲有關的毒素，例如 Mcf 毒素 (makes caterpillars floppy toxin) 等 (Daborn *et al.*, 2002; Makrokhazi *et al.*, 2003)。Mcf 基因可能是共生細菌中最基本的毒素，存在於所有光桿菌菌株中 Mcf 蛋白破壞昆蟲中腸上皮細胞 (Daborn *et al.*, 2002)，但嚴格的胞內作用路徑仍然未知 (Dowling *et al.*, 2004)。Mcf 缺失的突變株的毒性明顯降低，說明 Mcf 是一種毒性主導因子。雖然目前文獻發表了許多殺蟲毒蛋白的核酸和氨基酸序列，對於殺蟲毒蛋白的種類、修飾方式、分泌類型、殺蟲機制、結構組成等方面，仍有待一步研究 (Clarke and Dowds, 1995; Daborn *et al.*, 2001)。

二、抗生物質

產生抗生物質是共生菌的普通特徵。多種抗生物質阻止了來自腸道和土壤環境中的微生物對蟲屍的二次感染，還可抑制其它昆蟲對被侵染昆蟲屍體的取食以及共生菌之間的競爭 (You, 2005)。不同種或同種不同菌株產生的抗生物質各不相同，大蠟蛾體內光桿菌 C9 菌株產生抗生複合物 (3, 5, 二羥基-4-異丙基-二苯乙烯) 抑制幼蟲腸道細菌 (Hu and Webster, 2000)。菌株 K122 產生 13 種小分子有機化合物，對細菌、真菌及其它種的線蟲有抑制作用。這些抗生物質可能由多聚亞胺合成酶基因控制合成，該基因在許多光桿菌基因組樣品中都有發現 (Ffrench-constant *et al.*, 2000)。光桿菌對病原細菌和真菌具有較廣譜拮抗性，尤其對植物病原真菌有較強的抑制效果，但目前相關抑菌成分仍只有極少數被研究或確認 (Paul *et al.*, 1981; McInerney *et al.*, 1991a; Chen *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995a, 1995b)

三、殺蟲、殺菌及殺線蟲

筆者實驗室已於2004年證實單獨使用光桿菌代謝產物分子量大於100kDa的毒蛋白複合體對鱗翅目具有很強的殺蟲活性，是一種廣譜殺蟲蛋白；對於測試之病原真菌亦具有廣譜拮抗性。筆者實驗室利用光桿菌代謝產物分子量大於100kDa的毒蛋白複合體，針對於台灣本土重要害蟲，例如小菜蛾、大蠟蛾、玉米穗蟲、斜紋夜蛾、擬尺蠖與甜菜夜蛾等鱗翅目昆蟲進行室內殺蟲譜試驗。由試驗結果得知分子量大於100kDa的毒蛋白複合體對於小菜蛾和大蠟螟的半致死濃度分別為56 ppm與200 ppm，顯示其具有顯著殺蟲效果，甚至不亞於市售蘇力菌商品。另有報告顯示光桿菌(*P. luminescens* subsp. *laumondii*)之GPS12及GPS11品系，對洋菇害蠹(*Luciaphours* sp. 矮蒲蠹科)雌蠹能造成很高的致死率(Bussaman *et al.*, 2006)。又，光桿菌(*P. temperata*)對西方薊馬和蔥薊馬均有良好的殺蟲活性(Gerritsen *et al.*, 2005)。為瞭解光桿菌菌液對植物病原真菌的抑制效果，本研究實驗室進行政玫瑰灰黴病菌、檸檬炭疽病菌、蘋果褐斑病菌、甜椒疫病菌、香蕉炭疽病菌、百合灰黴病菌、豌豆镰胞菌、番茄镰胞菌、水稻立枯絲核菌與百合白絹病菌的對峙試驗。試驗結果顯示除了對百合白絹病菌沒有明顯抑制效果外，對於其他9種植物病原真菌都有明顯抑制效果，尤其對於玫瑰灰黴病菌、檸檬炭疽病菌、蘋果褐斑病菌、甜椒疫病菌具有相當顯著抑菌效果。其中，我們也針對檸檬炭疽病菌進行檸檬生物檢定(bioassay)，證實光桿菌菌液有良好的防治效果。另外，進行光桿菌"菌體及其代謝產物混合液"對細菌的抑制試驗，結果發現對於仙人掌菌、沙門氏菌、大腸桿菌、黑腐病原細菌、胡蘿蔔軟腐桿菌與菊花軟腐桿菌等6種細菌全部都有明顯的抑菌效果(Hsieh *et al.*, 2004, Hsieh *et al.*, 2005 Hsieh *et al.* 2006)。也有研究發現光桿菌的抗生物質可以殺死松材線蟲(Hu *et al.*, 1999)。

白殭菌 (*Beauveria bassiana*) 之植物内生定殖 (endophytic colonization) 和植物病蟲害防治

將分離自叩頭蟲之白殭菌(*B. bassiana* 11-98)施用到番茄和棉花種子時，可於其幼苗產生植物内生定殖，並可保護其不受立植絲核菌(*Rhizoctonia solani*)和落花生凋萎病菌(*Pythium myriotylum*)等植物病原為害。病害防治之程度，因接種於種子上白殭菌分生孢子之族群密度和土壤種類而有所差異。白殭菌11-98可誘導棉花對細菌性斑點病(*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*)產生系統性抗病性，(systemic resistance)。寄生性分析(parasitism assays)亦可觀察到白殭菌菌絲纏繞在落花生凋萎病(*P. myriotylum*)菌絲周圍的現象，此研究顯示白殭菌兼具殺蟲和殺菌之功能。(Ownley *et al.*, 2004, Ownley *et al.*, 2007.)

又，白殭菌亦能於玉米產生植物內生定殖，對歐洲玉米蟲具殺蟲之功效 (Wagner and Lewis, 2000)。類似的研究亦指出白殭菌 G41 能於香蕉植株內產生內生定殖，可以防治香蕉球莖象鼻蟲 (*Cosmopoties sordidus*) (Akello *et al.* 2007)。

參考文獻

- Ahern, M., S. Verschueren, and D. Van Sinderen. 2003. Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiol Lett.* 220: 127-131.
- Akello, J., T. Dubois, C. S. Gold, D. Coyne, J. Nakavuma, and P. Paparu. 2007. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (Musa spp.) . *J. Invertebr. Pathol.* 96: 34-42.
- Barboza-Corona, J. E., J. C. Contreras, R. Vel'aquez-Robledo, M. Bautista-Justo, M. Go'mez-Rami'rez, R. Cruz-Camarillo, and J. E. Ibarra. 1999. Selection of chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.* 21:1125-1129.
- Blackburn, M., E. Golubeva, D. Bowen, and R.H. ffrench-Constant. 1998. A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*, toxin complex a (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3036-3041.
- Boemare, N. E., R. J. Akhurst, and R.G. Mourant.1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 249-255.
- Bowen, D., J. and J. C. Ensign. 1998. Purification and characterization of a high-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3029-3035.
- Bowen, D., T. A. Rocheleau, M. Blackburn, O. Andreev, E. Golubeva, R. Bhartia, and R. H. ffrench-Constant. 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science.* 280, 2129-2132.
- Broderick, N. A., R. M. Goodman, K. F. Raffa, and J. Handelsman. 2000. Synergy between zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against Gypsy moth (Lepidoptera : Lymantriidae) *Environ. Entomol.* 29: 101-107.
- Bussaman, P., R. W. Sermswan, and P. S. Grewal. 2006. Toxicity of the entomopathogenic bacteria *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* to the mushroom mite (*Luciaphorus* sp.; Acari: Pygmephoridae). *Biocontrol Science and Technology* 16, 245-256.
- Chen, G., G. B. Dunphy, and J. M. Webster. 1994. Antimycotic activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis*. *Biol. Control.* 4, 157-162.
- Cherif, A, W. Rezgui, N. Raddadi, D. Daffonchio, and A. Boudabous. 2006. Characterization and

- partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110. *Microbiol. Res.* 171:451-479.
- Cherif, A. H. Ouzari, D. Daffonchio, H. Cherif, K. Ben Slama, A. Hassen, S. Jaoua, and A. Boudabous. 2001. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG 1.7, a new strain isolated from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 32:243-247.
- Cherif, A., S. Chehimi, F. Limem, B. M. Hansen, N. B. Hendriksen, D. Daffonchio, and A. Boudabous. 2003. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD 9. *J. Appl. Microbiol.* 95: 990-1000.
- Clarke, D.J., and B. C. A. Dowds. 1995. Virulence mechanisms of *Photorhabdus* sp. strain K122 toward wax moth larvae. *J. Invert. Pathol.* 66, 149-155.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baun, A. Bravo, and D. H. Dean. 2007. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [http : //www.lifesci. sussex. ac. uk/Home/Neil.Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil.Crickmore/Bt/)
- Daborn, P. J., N. Waterfield, M. A. Blight, and R. H. ffrench-Constant, 2001. Measuring virulence factor expression by the pathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* in culture and during insect infection. *J. Bacteriol.* 183, 5834-5839.
- Daborn, P.J., N. Waterfield, C. P. Silva, C. P. Y. Au, S. Sharma, and R. H. ffrench-Constant. 2002. A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 10742-10747.
- Dong, Y. H., X. F. Zhang, J. L. Xu, and L. H. Zhang. 2004. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia Carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 954-960.
- Dowling, A. J., P. J. Daborn, N. R. Waterfield, P. Wang, C. H. Streuli, and R. H. ffrench-Constant. 2004. The insecticidal toxins Makes caterpillars floppy (Mcf) promote apoptosis in cells mammalian. *Cell. Microbiol.* 6: 345-353.
- Ensign, J. C. 1998. Insecticidal protein toxins from *Photorhabdus*. World Intellectual Property. Patent WO1998/08932 A1.
- Environmental Protection Agency. 2003. *Bacillus thuringiensis* Vip3A insect control protein as expressed in event COT102 : notice of filing a certain pesticide chemical in or on food. *Fed. Regist.* 68: 66422-66425.
- Estruch, J. J., G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig, and M. G. Koziel. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5389-5394.
- Estruch, J. J., M. G. Koziel, C. G. Yu, N. M. Desai, G. J. Nye, and G. W. Warren. 1998. Plant pest control. World Intellectual Property. Patent WO 9844137.
- Favret, M. E., and A. A. Yousten. 1989. Thuricin : The bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 53: 206-216.

- Ffrench-Constant, R. H., N. Waterfield, P. J. Daborn, S. Joyce, H. Bennett, C. P. Y. Au, A. Dowling, S. Boundy, S. Reynolds, and D. Clarke. 2003. *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. *FEMS Microbiol Rev* 26, 433-456.
- Ffrench-Constant, R. H., N. Waterfield, V. Burland, N. T. Perna, P. J. Daborn, D. Bowen, and F. R. Blattner. 2000. A genomic sample sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* W14: potential implications for virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3310-3329.
- Fischer-Le Saux, M., V. Viallard, B. Brunel, P. Normand, and N. E. Boemare. 1999. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1645-1656.
- Forst, S., B. Dowds, N. Boemare, and E. Stackebrandt. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 47-72.
- Gay, E. J., K. D. Lee, A. M. Souleimanov, M. R. Di Falco, X. Zhou, A. Ly, T. C. Charles. B. T. Driscoll, and D. L. Smith. 2006. A novel bacteriocin, thuricin, 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *J. Appl. Microbiol.* 100: 545-554.
- Gerristen, L. J. M., J. Georgieva, and G. L. Wieggers. 2005. Oral toxicity of *Photorhabdus* toxins against thrips species. *J. Invertebr. Pathol.* 88: 207-211.
- Han, S., J. A. Craig, C. D. Putman, N. B. Carozzi, and J. A. Tainer. 1999. Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. *Nat. Struct. Biol.* 6: 932-936.
- Handelsman, J., S. Raffel, E. H. Mester, L. Wunderlich, and C. R. Grau. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:713-718.
- Hathout, Y., Y. P. Ho, V. Ryzhov, P. Demirev, and C. Fenselau. 2000. Kuratakins : a new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *J. Nat. Prod.* 63: 1492-1496.
- He, H., L. A. Silo-Suh, J. Clardy, and J. Handelsman. 1994. Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus*. *Tetrahedron Lett.* 35:2499-2502.
- Hsieh, F. C., C. Y. Tzeng, and S. S. Kao. 2005. A new isolate of the entomopathogenic nematophilic nematode, *Heterorhabditis brevicaudis* TG01 (Rhabditida : Heterorhabditidae) from Taiwan. *Plant Prot. Bull.* 47: 263-271.
- Hsieh, F. C., C. Y. Tzeng, and S. S. Kao. 2006. An entomopathogenic-nematophilic bacterium, *Photorhabdus luminescens*, with insecticidal and antimicrobial activities. P.30. in Program and Abstracts of Taiwan-Japan-Czech Republic Tri-countries Cooperation Symposium on Entomology, April 18-22. 2005. National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- Hsieh, F. C., C. Y. Tzeng, and S. S. Kao. 2007. Bioactivities of *Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*, a symbiont of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis brevicaudis* p.101 In Annual

- Meeting of the Invertebrate Pathology and the 1st International Forum on Entomopathogenic Nematodes and Symbiotic Bacteria August 12-16. Universite Laval in Quebec City, Canada.
- Hsieh, F. C., T. C. Lin, J. T. Tseng, and S. S. Kao. 2004. An entomopathogenic nematophilic bacterium, *Photorhabdus luminescens*, with insecticidal and antimicrobial activities. *Plant Prot. Bull.* 46: 163-172. (in Chinese with English summary)
- Hu, K., and J. M. Webster. 2000. Antibiotic production in relation to bacterial growth and nematode development in *Photorhabdus-Heterorhabditis* infected *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 219-223.
- Hu, K., J. Li, and J. M. Webster. 1999. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens* (enterobacteriaceae), bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology*. 1, 457-469.
- Jones, J. 2001. Bioposticides. *Pesticide Outlook*. 12: 134-135.
- Kamoun, F., H. Mejdoub, H. Aouissaoui, J. Reinbolt, A. Hammami, and S. Jaoua. 2005. Purification, amino acid sequence and characterization of bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* J. *Appl. Microbiol* 98: 881-888.
- Lee, M. K., F. S. Walters, H. Hart, N. Palekar, and J. S. Chen. 2003. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4648-4657.
- Li, J., G. Chen, H. Wu, and J. M. Webster. 1995b. Identification of two pigments and a hydroxystilbene antibiotic from *Photorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4329-4333.
- Li, J., G. Chen, J. M. Webster, and E. Czyceskwa. 1995a. Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *J. Nat. Prod.* 58, 1081-1085.
- Manker, D. C., W. D. Lidster, R. L. Starnes, and S. C. MacIntosh. 1994. Potentiator of *Bacillus* pesticidal activity. Patent cooperation treaty, WO94/09630.
- Marokhazi, J., N. Waterfield, G. LeGoff, E. Feil, R. Stabler, J. Hinds, A. Fodor, and R. H. French-Constant. 2003. Using a DNA microarray to investigate the distribution of insect virulence factors in strains of *Photorhabdus* bacteria. *J. Bacteriol.* 185, 4648-4656.
- McInerney, B. V., R. P. Gregson, M. J. Lacey, R. J. Akhurst, G.R. Lyons, S. H. Rhodes, D. R. Smith, L. M. Engelhardt, and A. H. White. 1991a. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J. Nat. Prod.* 54, 774-784.
- McInerney, B. V., W. C. Taylor, M. J. Lacey, R. J. Akhurst, and R. P. Gregson. 1991b. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *J. Nat. Prod.* 54, 785-795.
- Milat, M. L., P. Ricci, and J. P. Blein. 1991. Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogin. *Phytochemistry*. 30:2171-2173.
- Nunez-Valdez, E. 1997. *Bacillus thuringiensis* conference in Thailand: A widening "umbrella". *Nature Biotechnol.* 15: 225-226.

- Osburn, R. M., J. L. Milner, E. S. Oplinger, R. S. Smith, and J. Handelsman. 1995. Effect of *Bacillus cereus* UW85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin. *Plant Dis.* 79:551-556.
- Ownley, B. H., M. R. Griffin, W. E. Klingman, K. D. Gwinn, J. K. Moulton, and R. M. Pereira. 2007. *Beauveria bassiana* : endophytic colonization and poant disease control. pp. 63-64. *In* The 40th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology and the 1st International Forum on Entomopathogenic Nematodes and Symbiotic Bacteria, August 12-16, Universite Laval in Quebec City, Canada.
- Ownley, B. H., R. T. Lartey, R. M. Pereira, A. J. Caesar, W. E. Klingman, N. B. Quigley, and B. M. Leckie. 2004. *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism with activity against insect pests and plant pathogens pp.255-269. *In* R. T. Lartey, A. J, Caesar, eds. Emerging comcepts in plant health mangagement. Research Signpost, Kerala, India.
- Paik, H. D., S. S. Bae, S. H. Park, and J. G. Pan. 1997. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 19: 294-298.
- Paul, V. J., S. Frautschy, W. Fenical, and K. H. Nealson. 1981. Antibiotics in microbial ecology. Isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. *J. Chem. Ecol.* 7, 589-597.
- Qiu, D. W. 2004. Microbe protein pesticide and it's prospect. *Chinese J. Biol. Control* 20:91-94. (in Chinese)
- Qiu, D. W. 2006. Research and development on activator protein biopesticide. pp. 54-56 *In* : S. C. Wong, Y. M. Tzeng, S. S. Kao. C. C. Ho, and L. M. Hsu, eds. Proceedings of 2006 cross-strait symposium on the sustainable utilization of environmental resources and biocontrol of crop pests. Chaoyang University of Technology. (in Chinese)
- Ragni, A., F. Valentini, and B. Fridlender. 1998. Insecticidal bacteria. World Interlectual Property. Patent WO/1998/005212.
- Rang, C., P. Gil, N. Neisner, J. Van Rie, and R. Frutos. 2005. Novel Vip3-related protein *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Enciron. Microbiol.* 71: 6276-6281.
- Regev, A., M. Keller, N. Strizhov, B. Sneh, E. Prudovsky, I. Chet, I. Ginzberg, Z. Koncz-Kalman, C. Koncz, J. Schnell, and A. Zilberstein. 1966. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ --endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3581-3586.
- Reyes-Rami' rez, A., B. I. Escudero-Abarca, P. M, Hayward-Jones, and J. E. Barboza-Corona. 2004. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds, *J. Food Sci.* 69:131-134.
- Selvapandiyam, A., N. Arora, R. Rajagopal, S. K. Jalali, T. Venkatesan, S. P. Singh, and R. K. Bhatnagar. 2001. Toxicity analysis of N-and C-terminals-deleted vegetative insecticidal protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5855-5858.
- Shao, L., Z. H. Yuan, J. Cai, Y. H. Chen, and G. X. Ren. 2005. Screening of zwittermicin A-producing

- Bt strains and tests of their antagonistic spectrum. P. 374 In H. W. Yang, ed. Biocontrol of China in 21 Century. Chinese Agricultural Technology Press. Beijing. (in Chinese)
- Silo-Suh, L. A., B. J. Lethbridge, S. J. Raffel, H. He, J. Clardy, and J. Handelsman. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. Appl. Environ. Microbiol. 60:2023-2030.
- Silo-Suh, L. A., E. V. Stabb, S. J. Raffel, and J. Handelsman. 1998. Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. Curr. Microbiol. 37:6-11.
- Terce'-Laforgue, T., J. -C. Hnet, and <ill> J. -C. 1992. Biosynthesis and secretion of cryptogein, a protein elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*. Plant Physiol. 98:936-941.
- Wagner, B. L., and L. C. Lewis. 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3468-3473.
- Warren, G. W. 1997. Vegetative insecticidal proteins : novel proteins for control of corn pests. pp. 109-121. In N. Carozzi and M. Koziel, eds. Advances in insect control : the role of transgenic plants. Taylor and Frances, Lomdon, UK.
- Waterfield, N., P. J. Daborn, and R. H. ffrench-Constant. 2002. Genomic islands in *Photorhabdus*. Trends Microbiol. 10, 541-545.
- Wei, Z. M., R. J. Laby, C. H. Zumoff, D. W. Bauer, S. Y. He, A. Collmer, and S. V. Beer. 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science. 257:85-88.
- You, J., S. Z. Liang, and R. C. Han. 2005. Advances in the research on crystalline inclusion proteins produced by symbiotic bacteria associated with entomopathogenic nematodes *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. Nature Enemies of Insects. 27:76-82. (in Chinese with English summary)
- Yu, C. G., M. A. Mullins, G. W. Warren, M. G. Koziel, and J. J. Estruch. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. Appl. Environ. Microbiol. 63: 532-536.
- Zhang, H. M., Y. Y. Cai, and J. Chen. 1999. Elicitation of the hypersensitive responses in tobacco by a 10.6kD proteinaceous elicitor from *Phytophthora palmin*. Acta Bot. Sin. 41:1183-1186. (in Chinese with English summary)

Recent Advances in Biopesticides

Suey-Sheng Kao¹ and Feng-Chia Hsieh

Abstract

Biopesticides is considered to be the main component of integrated pest management (IPM) in green agriculture. Furthermore, the extensive use of modern biotechnology opens a new window for the development of novel biopesticides. This article reviews main advances in development of biopesticides both in Taiwan and abroad, including polyvalent *Bacillus thuringiensis* for plant pests control, new type of microbial protein pesticides, multifunctional symbiotic bacterium, *Photorhabdus luminescens* and entomopathogenic *Beauveria bassiana*, as an endophyte with dual biocontrol activity.

Key words : Polyvalent *Bacillus thuringiensis*, microbial protein pesticides, *Photorhabdus luminescens*, *Beauveria bassiana*

¹ Biopesticides Division, Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, 11, Kuang-Ming Rd., Wu-feng, Taichung Hsien 413 Taiwan, R.O.C.