

台灣地區咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei*) 分離之 *Isaria javanica* CAES1 鑑定與致病性測試

梁鈺平¹ 王泰權^{1,*}

摘要

梁鈺平、王泰權。2020。台灣地區咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei*) 分離之 *Isaria javanica* CAES1 鑑定與致病性測試。台灣農業研究 69(2):132–146。

本研究自台灣咖啡田間感染真菌死亡的咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei*) 上，分離到蟲生真菌 CAES1，該菌株之菌落為白色至淡黃色或灰色，10–30°C均可生長，25°C菌絲生長速率最快。以光學顯微鏡檢視其無性產孢構造，其分生孢子梗分枝末端著生1–4個瓶梗，瓶梗細胞長寬約3.7–5.0–6.4 $\mu\text{m} \times 1.9$ –3.0–3.5 μm ，分生孢子串生，形狀呈橢圓形至長橢圓形，大小約為2.7–3.8–5.4 $\mu\text{m} \times 1.2$ –1.6–2.1 μm 。以核糖體內轉錄區間 (internal transcribed spacer; ITS)、translation elongation factor-1 α gene (TEF1) 及 β -tubulin 的核酸序列以最大似然法 (maximum likelihood; ML) 進行親緣關係樹的重建分析，結果顯示本菌株於3個基因所重建之親緣關係樹均歸類於 *Isaria javanica* 的支系。因此，根據型態及分子鑑定，本菌株應屬於 *I. javanica*。以 *I. javanica* CAES1 之分生孢子處理咖啡果小蠹，7 d 後之累計死亡率為100%，而觀察此菌感染後之產孢過程則發現，此菌於咖啡果小蠹死亡後約2.77 d \pm 0.17 d 即可於蟲體表面產生分生孢子。本研究為首篇於台灣之咖啡果小蠹上發現 *I. javanica* 之報告，且本菌對咖啡果小蠹具致病力，未來具有應用於田間防治咖啡果小蠹之潛力。

關鍵詞：咖啡果小蠹、*Isaria javanica*、台灣、生物防治。

前言

咖啡果小蠹 [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] (Coleoptera: Curculionidae) 為全球咖啡產區的重要害蟲之一，其雌成蟲於咖啡果實臍部鑽孔後，直接深入種仁產卵繁殖，幼蟲孵化後取食胚乳，直至果實資源殆盡。受害咖啡果於果實發育後期發育不良，且咖啡果小蠹侵入咖啡果實繁殖時，同時會攜入真菌感染生豆內部，造成咖啡生豆品質嚴重下降 (Damon 2000; Vega *et al.* 2009)。如無妥善防治則會造成嚴重損失，據估計每年此害蟲造成全球超過5億美元的損失 (Vega *et al.* 2002)。

目前國外主要採用整合防治法 (integrated pest management) 防治咖啡果小蠹，其整合

防治方法包括田間耕作防治、監測田間族群量，並於適當時機使用化學防治、釋放寄生性與捕食性天敵、懸掛誘殺陷阱及運用微生物殺蟲劑等 (Aristizábal *et al.* 2012; Aristizábal *et al.* 2016)。台灣目前尚未有任何咖啡果小蠹之推薦藥劑及可供於田間防治之天敵，僅能透過清園及懸掛咖啡果小蠹誘殺器之方法移除田間咖啡果小蠹的孳生源。由於化學防治有環境汙染及誘發害蟲抗藥性之缺點，例如目前國外已有咖啡果小蠹對於安殺番 (endosulfan) 產生抗藥性或是交互抗性的報告 (Brun *et al.* 1990, 1994)，而微生物殺蟲劑則有環境友善、不易造成抗藥性的優勢，且可使咖啡果小蠹在田間染病而造成流行病，顯示開發本土可應用的微

投稿日期：2019年9月9日；接受日期：2019年12月23日。

* 通訊作者：tcw@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。

生物防治資材之重要性。

現行於咖啡果小蠹上曾記錄分離到之蟲生真菌，包括白殭菌 *Beauveria bassiana*、黑殭菌 *Metarhizium anisopliae*、*Nomuraea rileyi*、*Isaria amoenerosea* (= *Paecilomyces amoeneroseus*)、*Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*)、*Isaria fumosorosea* (= *Paecilomyces fumosoroseus*)、*Isaria javanica* (= *Paecilomyces javanicus*)、*Purpureocillium lilacinum* (= *Paecilomyces lilacinus*)、*Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) 及 *Hirsutella eleutheratorum* 等 (Samson 1974; Vega *et al.* 1999; Bustillo *et al.* 2002; Wraight *et al.* 2018a; Wraight *et al.* 2018b)，其中，以白殭菌及黑殭菌之應用較為普遍，目前國外已有部分運用白殭菌與黑殭菌商品防治咖啡果小蠹之研究與應用 (De La Rosa-Reyes *et al.* 1995; De La Rosa *et al.* 1997; De La Rosa *et al.* 2000; Samuels *et al.* 2002; Vera *et al.* 2011; Balakrishnan & Prakash 2014)。於國內，作者實驗室目前於台灣之咖啡果小蠹上僅有分離到白殭菌之紀錄 (Liang & Wang 2018)，且尚無於田間實際運用微生物殺蟲劑防治咖啡果小蠹之研究。本研究自嘉義縣中埔鄉之咖啡園採集自然感染蟲生真菌而死亡之咖啡果小蠹，於其上分離到一 *Isaria* 屬之真菌。由於迄今尚無於台灣之咖啡果小蠹上分離到 *Isaria* 屬真菌之紀錄，故本研究描述及記錄此菌之型態及進行分子鑑定，以瞭解其種類及培養特性，並觀察此菌於咖啡果小蠹上之產孢過程，以作為未來利用此菌作為微生物防治之參考。

材料與方法

供試蟲源及蟲生真菌分離

本試驗所使用之咖啡果小蠹蟲源及蟲生真菌，皆採集自嘉義縣中埔鄉無施用化學農藥的咖啡果園。咖啡果小蠹根據 Chu *et al.* (2017) 所描述之人工飼養方式進行大量飼養，試驗時選取活動力較佳之雌成蟲作為試驗蟲源。蟲生真菌採集自咖啡果實臍部染病死亡的咖啡果小蠹雌成蟲，將蟲體以滅菌的鑷子自果實上移出後，以雙面膠黏貼於盛裝馬鈴薯葡萄糖瓊脂

培養基 [potato dextrose agar medium (PDA), Difco Inc., Detroit, MI, USA] 之塑膠培養皿上蓋內側，使蟲體上之分生孢子自然落下至培養基上，再移植長出之菌落至新的 PDA，所得菌株編號為 CAES1。

菌落形態及菌絲於不同溫度與培養基中之生長速率

將分離株 CAES1 培養於 PDA 上，待其產孢後，將分生孢子分散於 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 中，利用血球計數器計算並調整孢子濃度為 10^7 conidia mL⁻¹。將直徑 6 mm 之無菌濾紙片 (Advantec Toyo Ltd., Tokyo, Japan) 置於沙氏葡萄糖瓊脂酵母培養基 [Sabouraud dextrose agar medium with yeast extract (SDAY); 含 40 g L⁻¹ dextrose、10 g L⁻¹ peptone、10 g L⁻¹ yeast extract 及 15 g L⁻¹ agar]、麥芽抽出物瓊脂培養基 [malt extract agar medium (MEA); 含 20 g L⁻¹ malt extract、1 g L⁻¹ peptone、20 g L⁻¹ dextrose 及 15 g L⁻¹ agar] 及 PDA 中央，滴加 5 μ L CAES1 分生孢子懸浮液於其上，再將培養基置於 10、15、20、25、30 及 35°C 之恆溫黑暗培養箱中，14 d 後測量菌落直徑。每處理共 6 重複。

產孢構造

將分離株 CAES1 培養於 PDA 上，於 25°C、黑暗之生長箱中培養 14 d 後，挑取產孢構造懸浮於 0.1% Triton X-100 中，置於玻片上，以干涉位相差 [differential interference contrast (DIC), Nikon, Tokyo, Japan] 顯微鏡觀察，並以 NIS-ElementsBR 3.0 軟體 (Nikon, Tokyo, Japan) 拍照後以 ImageJ 軟體測量 50 個以上之瓶梗及分生孢子大小。

分子生物學鑑定

以簡易 NaOH 萃取方式抽取 CAES1 之 DNA (Wang *et al.* 1993)，作為聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 之模版，並利用引子對 ITS4/ITS5 增幅核糖體內轉錄區間 (internal transcribed spacer; ITS) (600 bp)、983F/2218R 增幅 translation elongation factor-1 α gene (TEF1)

(1,000 bp)，以及 T1/T2、Bt1a/Bt1b、Bt2a/T222 和 T12/T22 增幅 β -tubulin 基因片段 (Glass & Donaldson 1995; O'Donnell & Cigelnik 1997; Rehner & Buckley 2005) (表 1)。PCR 反應使用 Fast-Run™ Taq Master kit (波仕特生物科技股份有限公司，台灣台北市)，添加物包括 5× Taq Master Mix 5 μ L、引子 (10 pmole μ L⁻¹) 各 0.5 μ L、ddH₂O 18 μ L 及 DNA 模版 1 μ L，總共 25 μ L。增幅 ITS 序列之 PCR 條件則為 94°C 1 min，1 個循環；94°C 1 min、55°C 1 min、72°C 2 min，35 個循環；72°C 5 min，1 個循環。TEF1 及 β -tubulin 則透過遞減式 (touchdown) PCR 方式增幅，反應條件為 94°C 2 min，1 個循環；94°C 30 s、66°C 30 s (每一個循環遞減 1°C)、72°C 60 s，9 個循環；94°C 30 s、56°C 30 s、72°C 60 s，33 個循環；72°C 10 min，1 個循環 (Shimazu & Takatsuka 2010; Gallou *et al.* 2016)。PCR 產物委託源資生物科技公司 (台灣台北市) 進行核酸定序工作，再將所得之序列與美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) 基因庫中所登錄之序列進行比對。

親緣關係樹之重建

由於以 NCBI 資料庫比對之結果顯示，

CAES1 之 ITS 序列與 *Isaria* 相似度最高，因此本研究親緣關係樹之重建參考 Gallou *et al.* (2016) 進行 *Isaria* 種類鑑別所使用之真菌的 ITS、TEF1 及 β -tubulin 序列 (附錄)，將基因序列以 Clustal X2 (Larkin *et al.* 2007) 進行序列比對。再經由 Genedoc 2.7 移除比對後序列的空隔 (gap)，之後以 jModelTest 2.1.10 (Darriba *et al.* 2012) 測試評估較佳之重建親緣關係樹模型，並以最大似然法 (maximum likelihood; ML) 進行親緣關係樹之模型重建。其中，ITS 及 β -tubulin 以 General Time Reversible model 搭配 Gamma Distributed with Invariant Sites，TEF1 則以 Tamura 3-parameter model 搭配 Gamma Distributed，並利用 Mega X (Kumar *et al.* 2018) 進行 1,000 次的 bootstrap 以重建親緣關係樹。

I. javanica CAES1 於咖啡果小蠹的產孢過程

以 *I. javanica* CAES1 分生孢子感染咖啡果小蠹的方法修改自 Vega *et al.* (2008) 之試驗方式，將 *I. javanica* CAES1 培養於 PDA 上，待其產孢後 (約 14 d)，將其分生孢子分散於 0.1% Triton X-100 中，並利用血球計數器計算並調整孢子濃度為 10⁸ conidia mL⁻¹。將直徑 6 mm 之無菌濾紙片放入 2 mL 無菌離心管

表 1. 本試驗 polymerase chain reaction (PCR) 及定序使用之引子序列及其標的基因。

Table 1. Primer sets and corresponding amplification targets.

Target gene ^z	Primer	Primer DNA sequence	Size (bp)	Reference
ITS	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	613	Rehner & Buckley (2005)
	ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'		
TEF1	983F	5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3'	1,034	Rehner & Buckley (2005)
	2218R	5'-ATGACACCRACRGCRCRGTGTYTG-3'		
β -tubulin	T1	5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3'	647	O'Donnell & Cigelnik (1997)
	T2	5'-TAGTGACCCTTGCCCCAGTTG-3'		
	Bt1a	5'-TTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	530	Glass & Donaldson (1995)
	Bt1b	5'-GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC-3'		
	Bt2a	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'	762	Glass & Donaldson (1995)
	T222	5'-GACCGGGGAAACGGAGACAGG-3'		
	T12	5'-AACAACTGGGCCAAGGGTCAC-3'	807	O'Donnell & Cigelnik (1997)
	T22	5'-TCTGGATGTTGTTGGGAATCC-3'		

^z ITS: internal transcribed spacer; TEF1: translation elongation factor-1 α gene.

中，滴加 10 μL 分生孢子懸浮液於濾紙片上，對照組則以無菌水 (含 0.1% Triton X-100) 取代孢子液。將人工飼養之咖啡果小蠹雌成蟲單隻夾入離心管中，再置於 25°C 黑暗之生長箱中，之後每日記錄其死亡率。本試驗之試驗組及對照組各處理 40 隻。另外，為計算感染後的產孢時間，以上述相同方式處理 40 隻咖啡果小蠹。其中，5 隻用於拍照記錄 *I. javanica* CAES1 感染咖啡果小蠹後之菌絲生長及產孢過程，其餘 35 隻則用於記錄咖啡果小蠹死亡後 *I. javanica* CAES1 於蟲體表面產生菌絲及孢子所需之時間。真菌生長狀況以實體顯微鏡 (S8APO stereomicroscope, Leica, Wetzlar, Germany) 觀察，搭配 EOS 700D (Canon, Tokyo, Japan) 數位相機及 EOSsight 即時影像測量拍照軟體 (KLO. Co. Ltd, Taipei, Taiwan)，拍攝 *I. javanica* CAES1 於咖啡果小蠹死亡後之菌絲生長及產孢過程。

結果

菌落及產孢構造型態

CAES1 於 SDAY、MEA 及 PDA 三種培養基上之菌落均為白色，其中於 MEA 上菌絲略呈灰色，PDA 上則為淡黃色。SDAY 上菌落邊緣略呈波浪狀，背面黃褐色，PDA 及 MEA 上則菌落邊緣為毛絮狀，背面乳黃色 (圖 1)。3 種培養基中，菌絲生長速率於 SDAY 上最快，而在 6 種測試的溫度中，CAES1 於 10–30°C 均可生長，於 25°C 生長速率最快。SDAY、MEA 及 PDA 培養 14 d 後之菌落直徑分別為 57.1 mm \pm 2.6 mm、46.2 mm \pm 1.2 mm 及 47.6 mm \pm 1.0 mm，而在 35°C 下則 3 種培養基上均無法觀察到可見之菌落 (圖 2)。

以光學顯微鏡檢視 CAES1 培養於 PDA 之無性繁殖構造，其營養菌絲平滑、透明、有隔，寬約 1.9–3.3 μm 。分生孢子梗寬約 2.0–3.0 μm ，分隔處或末端著生 1–3 個分枝，分枝末

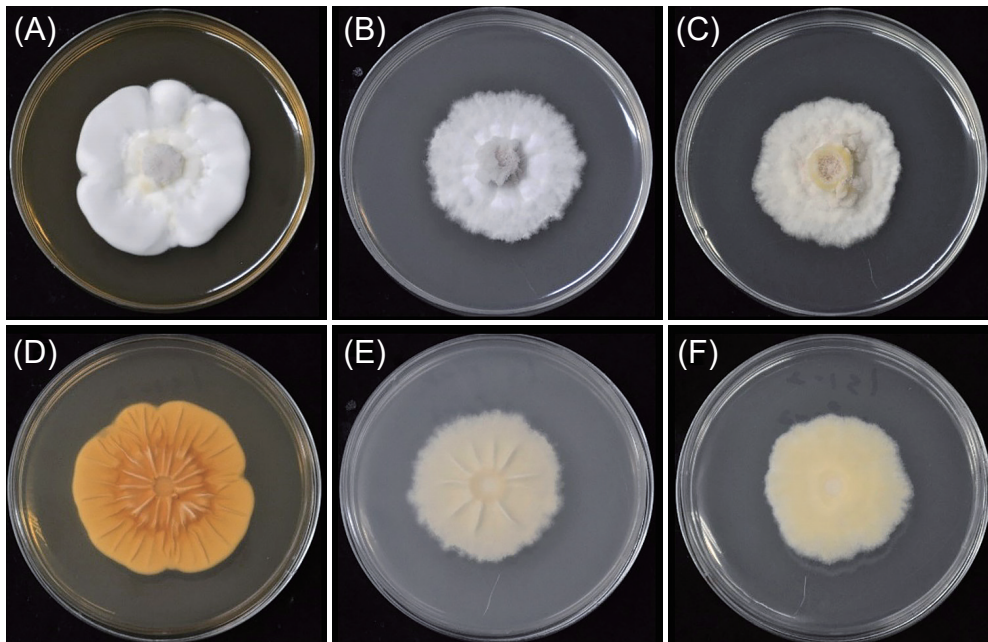


圖 1. *Isaria javanica* CAES1 於 (A、D) 沙氏葡萄糖瓊脂酵母培養基；(B、E) 麥芽抽出物瓊脂培養基；及 (C、F) 馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基培養 14 d (25°C) 後之菌落外觀 (A–C，正面；D–F，背面)。

Fig. 1. Colony morphology of *I. javanica* CAES1 after 14 d at 25°C. Colonies on (A, D) Sabouraud dextrose agar medium with yeast extract; (B, E) malt extract agar; or (C, F) potato dextrose agar (A–C, top view; D–F, reverse view).

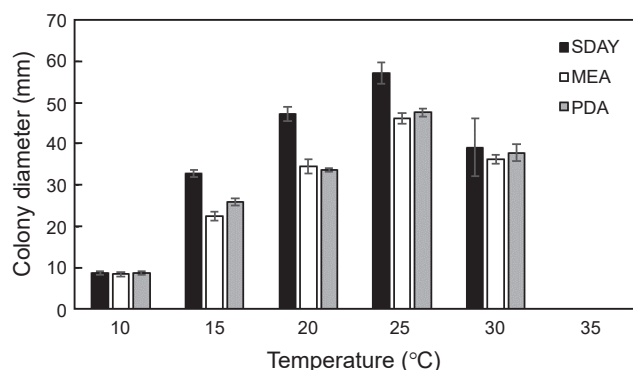


圖 2. *Isaria javanica* CAES1 在不同溫度下於 SDAY、MEA 及 PDA 培養 14 d 後之菌落直徑。

Fig. 2. Growth of *I. javanica* CAES1 at 14 d after culture on Sabouraud dextrose agar medium with yeast extract (SDAY), malt extract agar medium (MEA) and potato dextrose agar medium (PDA) at various temperatures.

端著生 1–4 個瓶梗，或瓶梗直接著生於分生孢子梗末端。瓶梗細胞長約 3.7–5.0–6.4 μm ，寬約 1.9–3.0–3.5 μm ，基部橢圓形，頂端尖細 (圖 3A)。分生孢子串生，分生孢子呈橢圓形至長橢圓形、單孢、透明、外壁平滑，大小約為 2.7–3.8–5.4 μm \times 1.2–1.6–2.1 μm (圖 3B)。

親緣關係樹之重建

本研究利用 ITS、TEF1 及 β -tubulin 以最大似然法進行親緣關係樹之重建，結果顯示 CAES1 於 3 種基因所建構的親緣關係樹皆被歸類於 *I. javanica* 的分支 (clade) 內 (圖 4–6)，bootstrap 值分別為 99、98 及 99，且皆與自咖啡果小蠹分離到 *I. javanica* CBS134.22 菌株歸於同一個分支，顯示 CAES1 應屬於 *I. javanica* 的台灣分離株。

I. javanica CAES1 於咖啡果小蠹的產孢過程

以 *I. javanica* CAES1 處理咖啡果小蠹，結果顯示咖啡果小蠹於第 3 天開始出現死亡，至第 7 天之累計死亡率達 100.0%，對照組則均無死亡。觀察咖啡果小蠹死亡後 *I. javanica* CAES1 的產孢過程 (圖 7)，發現咖啡果小蠹死亡 0.83 d \pm 0.15 d 後 CAES1 即可於蟲體表面產生細小菌絲 (圖 7B–7C)，這些菌絲會形成更粗的菌絲索，菌絲出現後平均約 1.94 d \pm 0.14 d 即可於菌絲上觀察到分生孢子產生 (圖 7D–7E)。整體而言，咖啡果小蠹遭受此菌感染死亡到此菌於蟲體表面產生分生孢子的時間約為 2.77 d \pm 0.17 d。

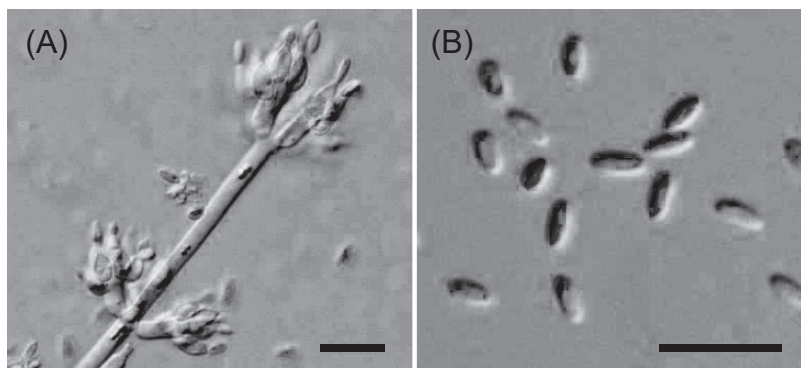


圖 3. *Isaria javanica* CAES1 之 (A) 產孢構造及 (B) 分生孢子 (比例尺 = 10 μm)。

Fig. 3. (A) Conidiogenous structures and (B) conidia of *I. javanica* CAES1 (bar = 10 μm).

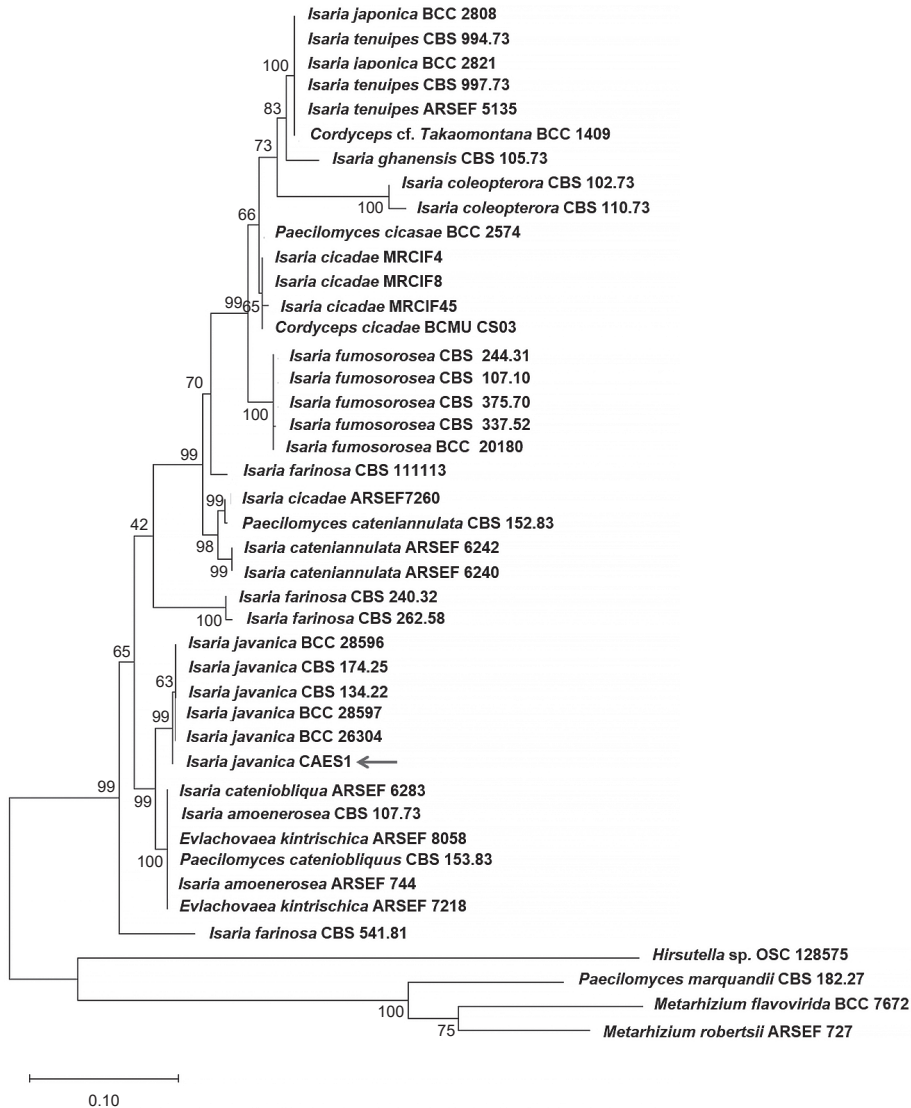


圖 4. 使用核糖體內轉錄區間 (ITS) 序列以最大似然法分析 *Isaria javanica* CAES1 的親緣關係。節點之數字表示分析 1,000 次重複之 bootstrap 值。比例尺代表核苷酸序列置換比率。*Hirsutella* sp. OSC 28575、*Paecilomyces marquandii* CBS 182.27、*Metarhizium flavovirida* BCC 7672 及 *Metarhizium robertsii* ARSEF 727 之序列使用作為外群。

Fig. 4. The phylogenetic analysis of *Isaria javanica* CAES1 using internal transcribed spacer (ITS) sequence by maximum likelihood method. The numbers at nodes indicate consensus bootstrap values based on 1,000 replications. Scale bar = 0.10 substitution per nucleotide position. Sequences from *Hirsutella* sp. OSC 28575, *Paecilomyces marquandii* CBS 182.27, *Metarhizium flavovirida* BCC 7672 and *Metarhizium robertsii* ARSEF 727 were used as outgroups.

討論

過去文獻對不同之 *I. javanica* 分離株之型態描述，瓶梗大小之描述彼此間不盡相同。Samson (1974)、Tzean *et al.* (1997)、Shima-

zu & Takatsuka (2010)、Kang *et al.* (2018) 及 Mongkolsamrit *et al.* (2018) 描述之瓶梗形狀較細長，長度分別為 8–14 μm 、5.2–11.1 μm 、4.6–13.5 μm 、7.98 $\mu\text{m} \pm 2.81 \mu\text{m}$ 及 6–10

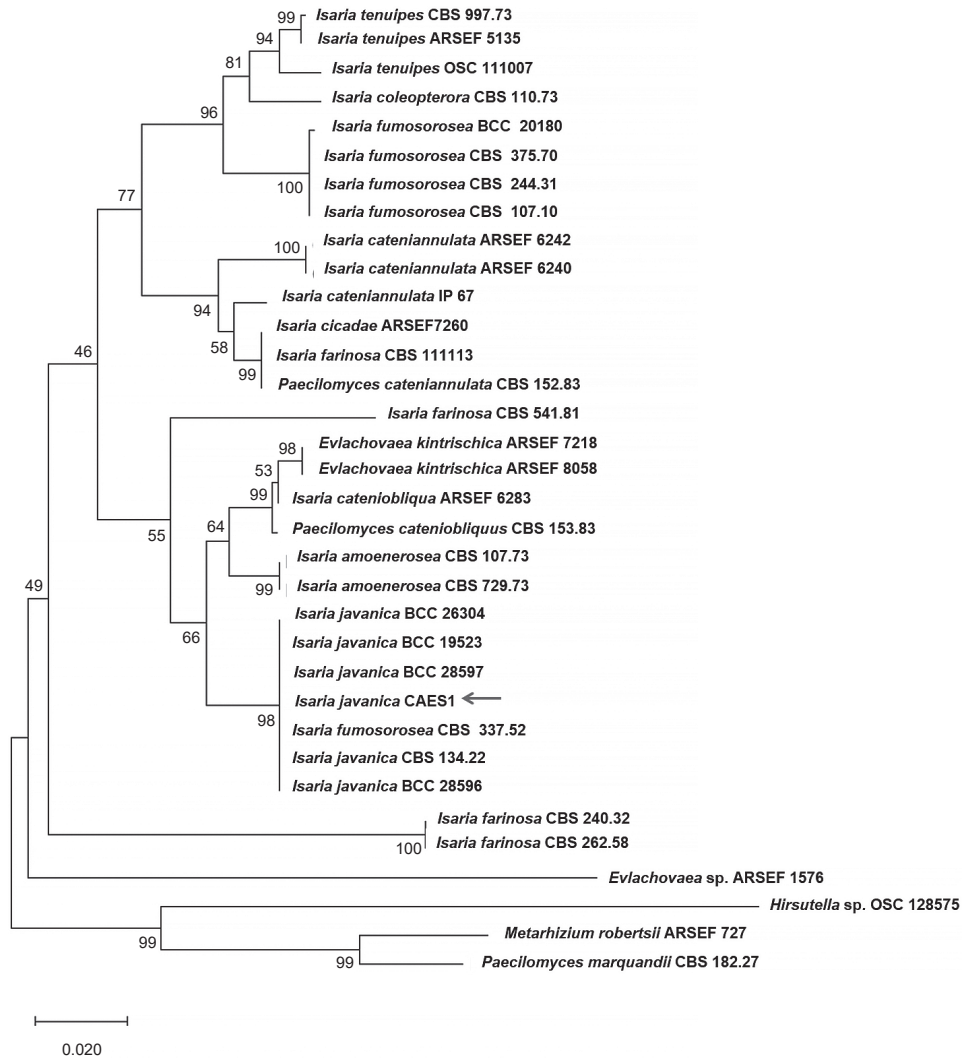


圖 5. 使用 TEF1 以最大似然法分析 *Isaria javanica* CAES1 的親緣關係。節點之數字表示分析 1,000 次重複之 bootstrap 值。比例尺代表核苷酸序列置換比率。*Paecilomyces marquandii* CBS 182.27、*Metarhizium flavovirida* BCC 7672 及 *Metarhizium robertsii* ARSEF 727 之序列使用作為外群。

Fig. 5. The phylogenetic analysis of *Isaria javanica* CAES1 using translation elongation factor-1 α gene (TEF1) by maximum likelihood method. The numbers at nodes indicate consensus bootstrap values based on 1,000 replications. Scale bar = 0.05 substitution per nucleotide position. Sequences from *Paecilomyces marquandii* CBS 182.27, *Metarhizium flavovirida* BCC 7672 and *Metarhizium flavovirida* ARSEF 727 were used as outgroups.

μm ，而 Cabanillas *et al.* (2013) 及 Gallou *et al.* (2016) 描述之瓶梗長度則較短，各分離株平均之瓶梗長度分別為 4.72–5.64 μm 及 4.81–5.73 μm ，與本研究之 *I. javanica* CAES1 分離株較相近。文獻記錄之分生孢子大小彼此間亦有所差異，例如 Samson (1974)、Tzean *et al.* (1997)、Shimazu & Takatsuka (2010)

描述之孢子長寬分別為 5.0–7.4 $\mu\text{m} \times 1.4$ –1.7 μm 、3.2–5.6 $\mu\text{m} \times 1.6$ –2.8 μm 、3.0–6.3 $\mu\text{m} \times 1.4$ –3.2 μm ，形狀則為紡錘形至橢圓形。本研究中 CAES1 分生孢子長寬為 2.7–3.8–5.4 $\mu\text{m} \times 1.2$ –1.6–2.1 μm ，與多數文獻相符合，形狀則較接近橢圓形。不同文獻關於 *I. javanica* 瓶梗及分生孢子之大小描述不盡相同，其原因可

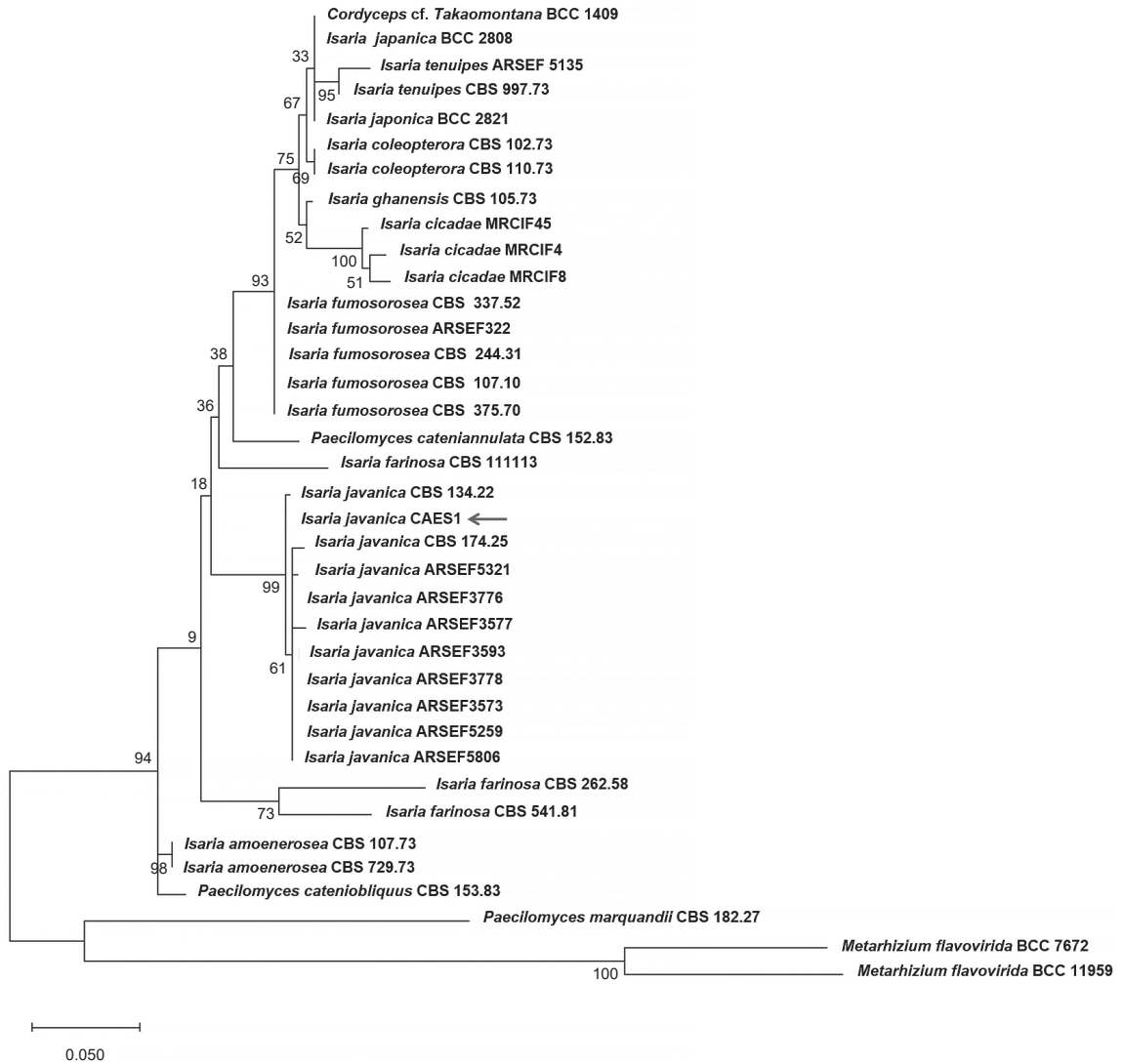


圖 6. 使用 β -tubulin 基因以最大似然法分析 *Isaria javanica* CAES1 的親緣關係。節點之數字表示分析 1,000 次重複之 bootstrap 值。比例尺代表核苷酸序列置換比率。*Paecilomyces marquandii* CBS 182.27、*Metarhizium flavovirida* BCC7672 及 *Metarhizium robertsii* ARSEF727 之序列使用作為外群。

Fig. 6. The phylogenetic analysis of *Isaria javanica* CAES1 using β -tubulin by maximum likelihood method. The numbers at nodes indicate consensus bootstrap values based on 1,000 replications. Scale bar = 0.05 substitution per nucleotide position. Sequences from *Paecilomyces marquandii* CBS 182.27, *Metarhizium flavovirida* BCC 7672 and *Metarhizium robertsii* ARSEF 727 were used as outgroups.

能來自菌株差異，例如 Kang *et al.* (2018) 描述 2 個不同之 *I. javanica* 分離株，其分生孢子長度分別為 $4.92 \mu\text{m} \pm 1.76 \mu\text{m}$ 和 $7.16 \mu\text{m} \pm 1.41 \mu\text{m}$ ，且彼此間有顯著差異。此外，不同培養條件亦可能為造成形態有些微差異之原因，例如 Mongkolsamrit *et al.* (2018) 描述之 *I.*

javanica 瓶梗大小，PDA 上為 $9.0 \mu\text{m} \times 2.0\text{--}2.5 \mu\text{m}$ ，MEA 上則為 $5\text{--}8 \mu\text{m} \times 2\text{--}3 \mu\text{m}$ ，分生孢子大小於 PDA 上為 $4.0 \mu\text{m} \times 2.0\text{--}2.5 \mu\text{m}$ ，MEA 上則為 $5.0\text{--}6.5 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$ 。此外，*I. javanica* 之有性世代為 *Cordyceps javanica*，屬於蟲草菌科 (Cordycipitaceae)，會於感染之蟲

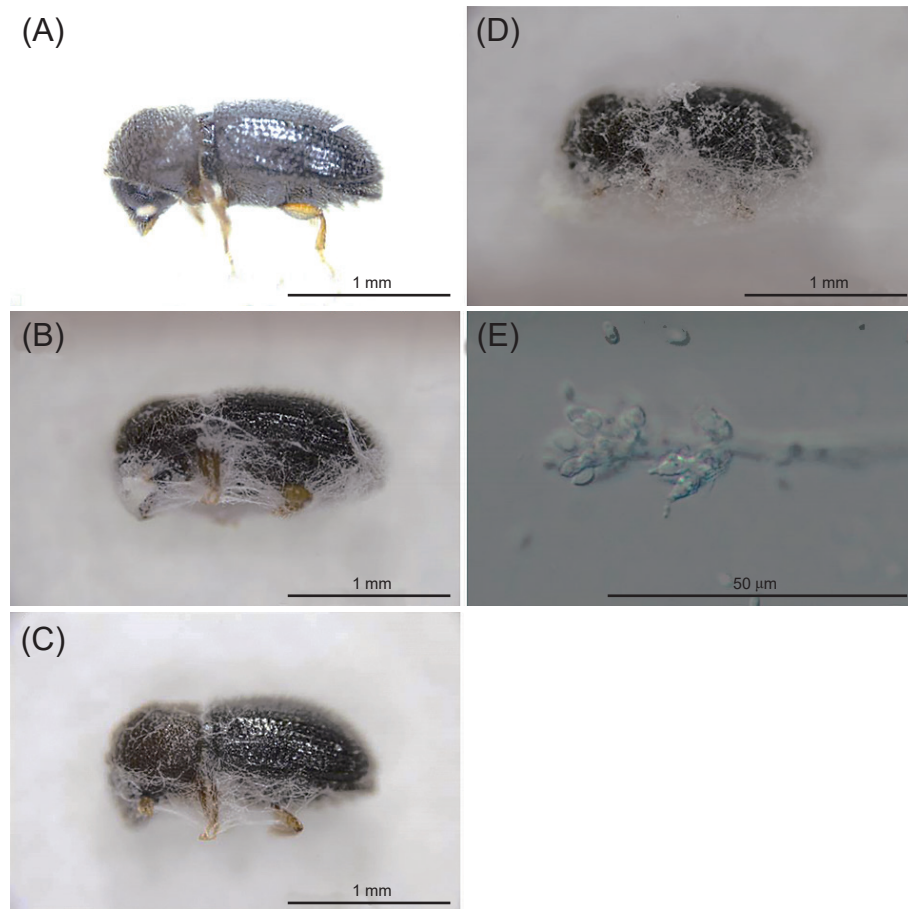


圖 7. *Isaria javanica* CAES1 感染咖啡果小蠹之菌絲生長及產孢情形。(A–D) 分別為死亡後第 0、1、2、3 d 之蟲體，(E) 為蟲體上產生之產孢構造及孢子。

Fig. 7. Outgrowth and sporulation of *Isaria javanica* CAES1 on coffee berry borers. (A–D) are cadavers on 0, 1, 2, and 3 d after the coffee berry borer was found dead, and (E) is conidiogenous structures and conidia on the cadaver.

體上產生圓柱形、橘紅色之子座 (stroma)，上有子囊殼 (perithecium) (Mongkolsamrit *et al.* 2018)，但本研究中尚未發現此菌於咖啡果小蠹蟲體上產生有性世代。

Isaria 屬之形態特徵為輪生的瓶梗，瓶梗基部膨大，頂端突然變窄，形成一尖端。分生孢子鏈生，單細胞、透明平滑、近球形或圓柱形，此些形態特徵與其他相近屬之真菌相同，因此過去分類十分紊亂 (Mongkolsamrit *et al.* 2018)。由於用以鑑定 *Isaria* 的型態特徵不甚可靠 (尤其是瓶梗及孢子形狀)，且無法分別自然的分類群 (Luangsa-Ard *et al.* 2005)，故 DNA 序列為目前鑑定 *Isaria* spp. 的重要依據，常用

之基因座 (locus) 包括 ITS、nuc 28S rDNA、*TEF1*、 β -*tubulin* 基因及 RNA polymerase II subunit (*RPB1* 及 *RPB2*) 等 (Shimazu & Takatsuka 2010; Gallou *et al.* 2016; Mongkolsamrit *et al.* 2018)。本研究使用 ITS、*TEF1* 及 β -*tubulin* 基因進行親緣關係樹的重建，在 ITS 與 β -*tubulin* 基因所構築的親緣關係樹中，皆顯示本研究所分離到的 *I. javanica* CAES1 被歸於 *I. javanica* 的分支中 (圖 4、圖 6)。其中，*TEF1* 所重建的親緣關係樹中，雖然 *I. javanica* CAES1 仍然被歸類於 *I. javanica*，但本分支中仍存有一支 *Isaria fumosorosea* CBS 337.52 (圖 5)。這與 Kepler *et al.* (2017) 利用小單位核醣體

(small subunit; SSU) DNA、大單位核醣體 (large subunit; LSU) DNA、TEF、RBP1 及 RBP 2 所構築的親緣關係樹中，將 *I. fumorsorosea* CBS 337.52 和其他 *I. fumorsorosea* 菌株歸於不同分支、而與 *I. javanica* CBS 134.22 歸屬於同一個分支的情形相同，顯示 *I. fumorsorosea* CBS 337.52 的部分序列可能與 *I. javanica* 較相似。

I. javanica 過去曾於數種寄主上分離到，包括鱗翅目 (Lepidoptera) 之吉普賽舞蛾 (*Lymantria dispar*)、棉花夜蛾 (*Spodoptera littoralis*)，半翅目 (Hemiptera) 之菸草粉蝨 (*Bemisia tabaci*)、銀葉粉蝨 (*Bemisia argentifolii*)、溫室粉蝨 (*Trialeurodes vaporariorum*)、柑桔木蝨 (*Diaphorina citri*)，以及蛛形綱之節肢動物等 (Scorsetti *et al.* 2007; Shimazu & Takatsuka 2010; Chen 2016; Gallou *et al.* 2016; Mongkol-samrit *et al.* 2018)。台灣過去曾有於銀葉粉蝨分離到 *I. javanica* 之紀錄 (Chen 2016)，且目前關於 *I. javanica* 之研究多為應用於粉蝨防治之研究。本研究首度於台灣之咖啡果小蠹上分離到此菌，以其分生孢子重新感染咖啡果小蠹

可使其發病，並可於蟲體表面產生大量分生孢子 (圖 7)。顯示此菌對咖啡果小蠹具致病性，且如應用於田間防治咖啡果小蠹，可於田間再次產生接種源，有機會於田間造成真菌病之流行，然而實際運用之方式及效果仍須更進一步研究。因此，未來仍須更進一步評估 *I. javanica* CAES1 於不同孢子濃度及環境條件下對咖啡果小蠹之防治效果、研發其大量生產方式及於田間施用方式及效果等，以提供農民另一環境友善之防治方法。

誌謝

本研究感謝林怡岑小姐協助咖啡果小蠹的飼養及蟲生真菌致病力試驗，呂宜蓁小姐協助整理親緣關係分類及校對資料，李佳勳先生協助進行分子鑑定工作，許淑麗小姐及蔡佳達先生協助菌絲生長速率試驗，國立台灣大學昆蟲學系保育及演化生物學實驗室曾惠芸助理教授協助親緣關係樹分析，亦感謝中埔福友咖啡農場負責人詹曜威先生提供果園進行咖啡果小蠹採樣及調查。

附錄 本研究於親緣關係樹重建分析所使用之菌株及序列。

Appendix Reference isolate sequences obtained from GenBank for phylogenetic analyses.

Species and isolate number	GenBank accession number ^z		
	ITS	TEF1	β -tubulin
<i>Isaria japonica</i> BCC 2821	EU828662	-	AY624242
<i>Isaria japonica</i> BCC 2808	AY624199	-	AY624241
<i>Cordyceps</i> cf. <i>Takaomontana</i> BCC 1409	AY624198	-	AY624240
<i>Isaria tenuipes</i> ARSEF 5135	AY624196	JF416020	AY624234
<i>Isaria tenuipes</i> CBS 994.73	AY624187		
<i>Isaria tenuipes</i> CBS 997.73	AY624195	HM161731	AY624233
<i>Isaria tenuipes</i> OSC 111007	-	DQ522349	-
<i>Isaria coleopterora</i> CBS 102.73	AY624176	-	AY624215
<i>Isaria coleopterora</i> CBS 110.73	AY624177	JQ425689	AY624216
<i>Isaria ghanensis</i> CBS 105.73	AY624185	-	AY624223
<i>Cordyceps cicadae</i> BCMU CS03	AB085888	-	-
<i>Paecilomyces cicadae</i> BCC 2574	AY624175	-	-
<i>Isaria cicadae</i> MRCIF4	EU573331	-	EU604136
<i>Isaria cicadae</i> MRCIF45	EU573332	-	EU604138
<i>Isaria cicadae</i> MRCIF8	EU573333	-	EU604137
<i>Isaria cicadae</i> ARSEF 7260	HQ880826	HQ881017	-
<i>Isaria cateniannulata</i> ARSEF 6242	GU734760	GU734759	-
<i>Isaria cateniannulata</i> IP 67	-	GU734753	-
<i>Isaria cateniannulata</i> ARSEF 6240	GU734761	GU734758	-
<i>Paecilomyces cateniannulata</i> CBS 152.83	AY624172	JQ425687	AY624211
<i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF 322	-	-	EF585301
<i>Isaria fumosorosea</i> CBS 375.70	AY624183	HM161736	AY624221
<i>Isaria fumosorosea</i> CBS 244.31	AY624182	JQ425690	AY624220
<i>Isaria fumosorosea</i> CBS 107.10	AY624184	HM161735	AY624222
<i>Isaria fumosorosea</i> CBS 337.52	EF411219	MF416500	EF411239
<i>Isaria fumosorosea</i> BCC 20180	JQ425655	JQ425669	-
<i>Isaria javanica</i> BCC 19523	-	JQ425670	-
<i>Isaria javanica</i> BCC 28596	JQ425661	JQ425679	-
<i>Isaria javanica</i> BCC 28597	JQ425662	JQ425680	-
<i>Isaria javanica</i> BCC 26304	JQ425660	JQ425677	-
<i>Isaria javanica</i> CBS 134.22	DQ403723	JQ425683	EF585304
<i>Isaria javanica</i> CBS 174.25	MH854836		EF585302
<i>Isaria javanica</i> ARSEF 5321			FJ899919
<i>Isaria javanica</i> ARSEF 3577			FJ899914
<i>Isaria javanica</i> ARSEF 3776			FJ899916
<i>Isaria javanica</i> ARSEF 5259	-	-	FJ899918
<i>Isaria javanica</i> ARSEF 3778	-	-	FJ899917
<i>Isaria javanica</i> ARSEF 5806	-	-	EF585306
<i>Isaria javanica</i> ARSEF 3593	-	-	FJ899915
<i>Isaria javanica</i> ARSEF 3573	-	-	FJ899913

附錄 本研究於親緣關係樹重建分析所使用之菌株及序列 (續)。

Appendix Reference isolate sequences obtained from GenBank for phylogenetic analyses. (continued)

Species and isolate number	GenBank accession number ^z		
	ITS	TEF1	<i>β-tubulin</i>
<i>Isaria javanica</i> CAES1 (This study)	MN094459	MN215883	MN215882
<i>Isaria cateniobliqua</i> ARSEF 6283	GU734763	GU734749	-
<i>Paecilomyces cateniobliquus</i> CBS 153.83	AY624173	JQ425688	AY624212
<i>Isaria amoenerosea</i> CBS 107.73	AY624168	MF416494	AY624207
<i>Isaria amoenerosea</i> CBS 729.73		HM161732	AY624208
<i>Isaria amoenerosea</i> ARSEF 744	EU553281	-	-
<i>Isaria farinosa</i> CBS 111113	AY624181	MF416499	AY624219
<i>Isaria farinosa</i> CBS 541.81	AY624180	JQ425686	AY624218
<i>Isaria farinosa</i> CBS 240.32	AY624178	JQ425684	-
<i>Isaria farinosa</i> CBS 262.58	AY624179	JQ425685	AY624217
<i>Evlachovaea kintrischica</i> ARSEF 8058	GU734764	GU734750	-
<i>Evlachovaea kintrischica</i> ARSEF 7218	EU553278	GU734751	-
<i>Evlachovaea</i> sp. ARSEF 1576	-	GU734746	-
<i>Hirsutella</i> sp. OSC 128575	JN049845	EF469064	-
<i>Paecilomyces marquandii</i> CBS 182.27	AY624193	EF468793	AY624229
<i>Metarhizium flavoviride</i> BCC 7672	AY624203	-	AY624248
<i>Metarhizium flavoviride</i> BCC 11959	-	-	AY624249
<i>Metarhizium robertsii</i> ARSEF 727	HQ331453	DQ463994	-

^z ITS: internal transcribed spacer; TEF1: translation elongation factor-1 α gene. Boldface type indicates ex-type specimens.

引用文獻

- Aristizábal, L. F., O. Lara, and S. P. Arthurs. 2012. Implementing an integrated pest management program for coffee berry borer in a specialty coffee plantation in Colombia. *J. Integr. Pest Manag.* 3:G1–G5. doi:10.1603/IPM11006
- Aristizábal, L. F., A. E. Bustillo, and S. P. Arthurs. 2016. Integrated pest management of coffee berry borer: Strategies from Latin America that could be useful for coffee farmers in Hawaii. *Insects* 7:6. doi:10.3390/insects7010006
- Balakrishnan, M. M. and R. N. Prakash. 2014. Infectivity of ten *Metarhizium anisopliae* isolates to the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Entomol. Zool. Studies* 2:246–249.
- Brun, L. O., C. Marcillaud, V. Gaudichon, and D. M. Suckling. 1990. Monitoring of endosulfan and lindane resistance in the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. *Bull. Entomol. Res.* 80:129–135. doi:10.1017/S0007485300013341
- Brun, L. O., C. Marcillaud, V. Gaudichon, and D. M. Suckling. 1994. Cross resistance between insecticides in coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from New Caledonia. *Bull. Entomol. Res.* 84:175–178. doi:10.1017/S0007485300039651
- Bustillo, A. E., R. Cardenas, and F. J. Posada. 2002. Natural enemies and competitors of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Colombia. *Neotrop. Entomol.* 31:635–639. doi:10.1590/S1519-566X2002000400018
- Cabanillas, H. E., J. H. de Leon, R. A. Humber, K. D. Murray, and W. A. Jones. 2013. *Isaria poprawskii* sp. nov. (Hypocreales: Cordycipitaceae), a new entomopathogenic fungus from Texas affecting sweet potato whitefly. *Mycoscience* 54:158–169. doi:10.1016/j.myc.2012.09.009
- Chen, Y. 2016. The efficacy of the entomopathogenic fungus, *Isaria javanica* (Ascomycota: Hypocreales), as a biocontrol agent for management of the whitefly, *Bemisia argentifolii* (Bellows & Perring). Master Thesis, Department of Entomology, National Chung Hsing University. Taichung. Taiwan. 48 pp. (in Chinese with English abstract)
- Chu, Y. F., M. H. Yang, S. F. Chang, P. H. Chen, and T. C. Wang. 2017. The composition of life stages of coffee berry borer (Scolytidae: *Hypothenemus hampei*) in the coffee berry and the control efficacy of different insecticides for the pest. *J. Taiwan Agri. Res.* 66:318–325. doi:10.6156/JTAR/2017.06604.06
- Damon, A. 2000. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Bull. Entomol. Res.* 90:453–465. doi:10.1017/S0007485300000584
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada. 2012. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9:772. doi:10.1038/nmeth.2109
- De La Rosa, W., R. Alatorre, J. Trujillo, and J. F. Barrera. 1997. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). *J. Econ. Entomol.* 90:1534–1538. doi:10.1093/jee/90.6.1534
- De La Rosa, W., R. Alatorre, J. F. Barrera, and C. Torriello. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. *J. Econ. Entomol.* 93:1409–1414. doi:10.1603/0022-0493-93.5.1409
- De La Rosa-Reyes, W., J. L. Godinez-Aguilar, and R. Alatorre-Rosas. 1995. Biological activity of five strains of *Metarhizium anisopliae*, upon the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Col.: Scolytidae). *Entomophaga* 40:403–412. doi:10.1007/BF02373728
- Gallou, A., M. G. Serna-Domínguez, A. M. Berlanga-Padilla, M. A. Ayala-Zermeño, M. A. Mellin-Rosas, R. Montesinos-Matías, and H. C. Arredondo-Bernal. 2016. Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. *Fungal Biol.* 120:414–423. doi:10.1016/j.funbio.2015.11.009
- Glass, N. L. and G. C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1323–1330.
- Kang, B. R., J. H. Han, J. J. Kim, and Y. C. Kim. 2018. Dual biocontrol potential of the entomopathogenic fungus, *Isaria javanica*, for both aphids and plant fungal pathogens. *Mycobiology* 46:440–447. doi:10.1080/12298093.2018.1538073
- Kepler, R. M., J. J. Luangsa-ard, N. L. Hywel-Jones, C. A. Quandt, G. H. Sung, S. A. Rehner, M. C. Aime, T. W. Henkel, T. Sanjuan, R. Zare, M. Chen, Z. Li, A. Y. Rossman, J. W. Spatafora, and B. Shrestha. 2017. A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). *IMA Fungus* 8:335–353. doi:10.5598/imafungus.2017.08.02.08
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35:1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096

- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
- Liang, Y. P. and T. C. Wang. 2018. Preliminary study of virulence of *Beauveria bassiana* isolates from Taiwan against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). p.85. *in*: The 39th Annual Meeting of Taiwan Entomological Society. October 20–21, 2018. Tainan, Taiwan. Taiwan Entomol. Soc. Publ., Taipei. (in Chinese)
- Luangsa-Ard, J. J., N. L. Hywel-Jones, L. Manoch, and R. A. Samson. 2005. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycol. Res.* 109:581–589. doi:10.1017/S0953756205002741
- Mongkolsamrit, S., W. Noisriboom, D. Thanakitpipattana, T. Wutikhun, J. W. Spatafora, and J. Luangsa-Ard. 2018. Disentangling cryptic species with isaria-like morphs in Cordycipitaceae. *Mycologia* 110:230–257. doi:10.1080/00275514.2018.1446651
- O'Donnell, K. and E. Cigelnik. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.* 7:103–116. doi:10.1006/mpev.1996.0376
- Rehner, S. A. and E. Buckley. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: Evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97:84–98. doi:10.1080/15572536.2006.11832842
- Samson, R. A. 1974. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Stud. Mycol.* 6:1–119.
- Samuels, R. I., R. C. Pereira, and C. A. T. Gava. 2002. Infection of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) by Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Biocontrol Sci. Technol.* 12:631–635. doi:10.1080/0958315021000016298
- Scorsetti, A. C., R. A. Humber, C. De Gregorio, and C. C. L. Lastra. 2007. New records of entomopathogenic fungi infecting *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*, pests of horticultural crops, in Argentina. *Biocontrol* 53:787. doi:10.1007/s10526-007-9118-9
- Shimazu, M. and J. Takatsuka. 2010. *Isaria javanica* (anamorphic Cordycipitaceae) isolated from gypsy moth larvae, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), in Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 45:497–504. doi:10.1303/aez.2010.497
- Tzean, S. S., L. S. Hsieh, and W. J. Wu. 1997. Atlas of Entomopathogenic Fungi from Taiwan. Council of Agriculture, Executive Yuan. Taipei, Taiwan. 214 pp.
- Vega, F. E., G. Mercadier, and P. F. Dowd. 1999. Fungi associated with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). p.229–238. *in*: Proceedings of the 18th International Scientific Colloquium on Coffee. August 2–6, 1999. Helsinki, Finland. Association for Science and Information on Coffee, Paris.
- Vega, F. E., R. A. Franqui, and P. Benavides. 2002. Scientific note: The presence of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Puerto Rico: Fact or fiction? *J. Insect Sci.* 2:13. doi:10.1093/jis/2.1.13
- Vega, F. E., F. Posada, M. C. Aime, M. Pava-Ripoll, F. Infante, and S. A. Rehner. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biol. Control* 46:72–82. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.008
- Vega, F. E., F. Infante, A. Castillo, and J. Jaramillo. 2009. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): A short review, with recent findings and future research directions. *Terr. Arthropod Rev.* 2:129–147. doi:10.1163/187498209X12525675906031
- Vera, J. T., E. C. Montoya, P. Benavides, and C. E. Gónzaga. 2011. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as a control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) emerging from fallen, infested coffee berries on the ground. *Biocontrol Sci. Technol.* 21:1–14. doi:10.1080/09583157.2010.517605
- Wang, H., M. Qi, and A. J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21:4153–4154. doi:10.1093/nar/21.17.4153
- Wraight, S. P., S. Galaini-Wraight, R. L. Howes, L. A. Castrillo, R. I. Carruthers, R. H. Smith, T. K. Matsumoto, and L. M. Keith. 2018a. Prevalence of naturally-occurring strains of *Beauveria bassiana* in populations of coffee berry borer *Hypothenemus hampei* on Hawai'i Island, with observations on coffee plant-*H. hampei*-*B. bassiana* interactions. *J. Invertebr. Pathol.* 156:54–72. doi:10.1016/j.jip.2018.07.008
- Wraight, S. P., S. Galaini-Wraight, L. A. Castrillo, M. H. Griggs, L. M. Keith, and T. K. Matsumoto. 2018b. Collection, isolation, *in vitro* culture, and laboratory transmission of *Hirsutella eleutheratorum* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) from coffee berry borer on Hawai'i Island. *J. Invertebr. Pathol.* 157:53–66. doi:10.1016/j.jip.2018.08.002

Identification and Pathogenicity of *Isaria javanica* CAES1 Isolated from the Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*) in Taiwan

Yu-Ping Liang¹ and Tai-Chuan Wang^{1,*}

Abstract

Liang, Y. P. and T. C. Wang. 2020. Identification and pathogenicity of *Isaria javanica* CAES1 isolated from the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 69(2):132–146.

An isolate of entomopathogenic fungi, CAES1, was isolated from a naturally infected coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*; CBB) in a coffee field in Taiwan. Colonies of CAES1 were white to pale-yellow or grey. Mycelia could grow in range of 10°C to 30°C, with the optimal temperature at 25°C, ranging from 10°C to 30°C. The conidiophores formed branches with phialides in whorls of 1 to 4, with phialides 3.7–5.0–6.4 μm × 1.9–3.0–3.5 μm, and conidia forming in chain, 2.7–3.8–5.4 μm × 1.2–1.6–2.1 μm. CAES1 was identified as *Isaria javanica* based on morphology and phylogenetic analysis of the sequences of ribosomal internal transcribed spacer (ITS), translation elongation factor-1α (TEF1) and β-tubulin. The cumulative mortality rate of CBB was 100% on the 7th day after treated with conidia of *I. javanica* CAES1. *I. javanica* CAES1 sporulated on the surface of CBB 2.77 d ± 0.17 d after CBB died. This is the first record of *I. javanica* from CBB in Taiwan. It is suggested that *I. javanica* CAES1 is pathogenic to the CBB and could be a potential biocontrol agent against CBB in the future.

Key words: Coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*), *Isaria javanica*, Taiwan, Biological control.

Received: September 9, 2019; Accepted: December 23, 2019.

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

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