

咖啡葉片内生炭疽菌種類之研究

吳昭蓉¹ 許淑麗² 賴素玉² 林妙純² 倪蕙芳^{3,*}

摘要

吳昭蓉、許淑麗、賴素玉、林妙純、倪蕙芳。2022。咖啡葉片内生炭疽菌種類之研究。台灣農業研究 71(3):243–266。

本研究由南投縣仁愛鄉、雲林縣古坑鄉、嘉義縣中埔鄉及竹崎鄉、嘉義農業試驗分所、台南市東山區、台東縣泰武鄉等地 7 個咖啡園，採集健康咖啡葉進行表面消毒及組織分離，分離到之內生真菌共計有 859 株炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.)、475 株葉點黴屬真菌 (*Phyllosticta* spp.)、505 株炭角菌科 (Xylariaceae) 真菌及 214 株其他真菌。炭疽菌在 7 個咖啡園中所占比例最高。為進一步瞭解内生炭疽菌種類，利用 actin、calmodulin、chitin synthase、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 以及 β -tubulin 等序列，以貝氏演算法 (Bayesian inference) 建構類緣樹，結果顯示分離的炭疽菌種類包含 *Colletotrichum gloeosporioides* 複合種 (species complex)：*Colletotrichum cordylinicola*、*Colletotrichum fructicola*、*Colletotrichum gloeosporioides*、*Colletotrichum jiangxiense*、*Colletotrichum siamense*、*Colletotrichum theobromicola*、*Colletotrichum tropicale* 及 1 個尚未命名可能為新種的 *Colletotrichum* sp.，此外尚有 *Colletotrichum boninense* 複合種：*C. boninense* 及 *Colletotrichum karstii* 等共 10 種。針對南投仁愛、嘉義中埔、嘉義竹崎 3 個咖啡園進行葉片内生炭疽菌的種類及比例分析，發現南投仁愛及嘉義中埔之菌相種類組成較相近，其中 *C. cordylinicola* 在 2 園的比例分別占 83% 及 27%，且 2 園皆有 *C. siamense* 之存在。而嘉義竹崎咖啡園之炭疽菌則以 *C. karstii* 與 *C. fructicola* 比例最高，各占 45%，且未分離到 *C. cordylinicola* 及 *C. siamense*，而 *C. karstii* 則僅在嘉義竹崎咖啡園分離獲得，顯示咖啡葉内生炭疽菌種類具有豐富多樣性，且所組成之菌相依果園不同亦有所差異。本研究為國內外首篇利用多基因類緣分析方法解析咖啡葉片内生炭疽菌種類之報告，其結果可作為後續咖啡病害或內生菌相關研究之參考。

關鍵詞：咖啡、内生菌、炭疽菌。

前言

咖啡屬茜草科 (Rubiaceae) 植物，原產於熱帶非洲，1884 年引進台灣後少量推廣於民間種植，1918 年以後由園藝試驗場嘉義支場 (現今農業試驗所嘉義分所) 及士林園藝試驗分所進行咖啡試驗種植後，發現阿拉比卡咖啡最為適合台灣的風土環境，因此 1942 年之栽培面積曾達 1,000 ha，其後因二次世界大戰，多數咖啡田荒蕪，咖啡產業漸行式微。近年來，由

於傳統產業結合觀光休閒事業之推動及國民消費能力的提高，喝咖啡的人口數逐年增加，帶動咖啡種植的農友愈來愈多，栽培面積目前持續增加中 (Chang *et al.* 2011)，根據行政院農業委員會農糧署農情報告資源網所載之 2020 年統計資料顯示，咖啡總栽培面積約 1,153 ha，主要栽培縣市依栽培面積依序為屏東縣 (231 ha)、南投縣 (189 ha)、台東縣 (154 ha) 及嘉義縣 (135 ha)。

植物内生真菌為寄生於植物體內完成全部

投稿日期：2021 年 10 月 4 日；接受日期：2022 年 3 月 18 日。

* 通訊作者：hfni@tari.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植物保護系計畫助理。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副研究員兼系主任。台灣嘉義市。

或部分生活史，但通常並不造成植物顯現病徵的真菌 (Suryanarayanan 2013)。在農作物中，主要被報導的內生菌種類有 *Alternaria* spp.、*Aspergillus* spp.、*Chaetomium globosum*、*Cladosporium cladosporioides*、*Cladosporium* spp.、*Colletotrichum graminicola*、*Curvularia* spp.、*Epicoccum nigrum*、*Fusarium oxysporum*、*Fusarium* spp.、*Penicillium* spp.、*Scolecobasidium humicola*、*Trichoderma* spp.、*Xylaria* spp. 等 (Varma *et al.* 2017)。而其存在的功能，對於植物而言，已知內生菌可以幫助植物抵抗非生物逆境 (Saikkonen *et al.* 2010)、抑制植物病原菌、提高植物抗病或抗蟲的能力，有些重要且已被用來作為生物防治的蟲生真菌如白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 也被報導為棉花、菸草、小麥、大豆等之內生菌 (Arnold *et al.* 2003; Varma *et al.* 2017; Ramakuwela *et al.* 2020)。對於人類而言，研究內生菌可探索真菌的多樣性，具有學術價值，此外，內生菌產生豐富的次級代謝物及酵素，亦有應用於工業生產之潛力 (Debbab *et al.* 2011; Suryanarayanan *et al.* 2012)。

咖啡植株無論在根、莖、葉皆可發現內生菌的存在，不同部位的內生菌菌相各有差異，而葉部通常是內生菌數量及種類最豐富的部位 (Vega *et al.* 2010)。以咖啡全株而言，分離頻率最高的內生真菌為炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.)、*Fusarium* spp.、*Penicillium* spp. 以及炭角菌科 (Xylariaceae) 之真菌 (Vega *et al.* 2010)。如以根部為例，分離到最多的內生真菌依序為屬於炭角菌科之 *Xylaria* spp.、炭疽菌以及 *Guignardia* spp. (無性世代 *Phyllosticta* spp.) (Santamaría & Bayman 2005)。栽培方式亦會影響咖啡葉片內生菌的菌相，Oliveira *et al.* (2014) 比較咖啡慣行園和有機園的咖啡葉片內生菌菌相，發現慣行園分離頻率最高者為炭疽菌，有機園則是以 *Phyllosticta capitalensis* 為主。由以上研究，可知炭疽菌為咖啡中常見的內生菌，另外有部分研究指出，內生性的炭疽菌可能有抑制病原性炭疽菌的潛力 (Bongiorno *et al.* 2016)。

有關炭疽菌的分類，近年因為多基因類緣分析方法 (multi-locus sequence analysis) 發展，

Colletotrichum 屬重新分類，對於種間的解析度提高，產生多個新種，其寄主範圍及病原性各有差異，目前可歸類為 14 個不同的複合種 (species complex)，其包括 248 個被認定的物種 (Cannon *et al.* 2012; Damm *et al.* 2012a, 2012b; Weir *et al.* 2012; Vieira *et al.* 2014; Jayawardena *et al.* 2021)。在此分類體系之下，發現許多先前未報導過的 *Colletotrichum* spp. 可造成咖啡炭疽病，例如 *Colletotrichum gigasporum*、*Colletotrichum karstii*、*Colletotrichum siamense* 及 *Colletotrichum theobromicola* 在墨西哥咖啡葉片上造成壞疽斑 (Cristóbal-Martínez *et al.* 2017)，或是中國在咖啡上分離得到的 *Colletotrichum brevisporum*、*Colletotrichum endophytica*、*Colletotrichum ledongense* 及 *Colletotrichum tropicale* 可危害果實。至於內生菌，雖然已有多篇報導指出炭疽菌為咖啡上常見的內生真菌，惟目前研究中，多半以外觀型態 (Oliveira *et al.* 2014) 或 internal transcribed spacer (ITS) (Vega *et al.* 2010) 序列鑑定，且大部分僅能鑑定至屬或複合種。

咖啡在台灣之種植歷史超過 100 年，有紀錄的真菌病害共有 18 種 (Tzean *et al.* 2019)，包括由 *Cercospora coffeicola* 引起的咖啡褐眼病，由 *Hemileia vastatrix* 引起的咖啡銹病以及 *Colletotrichum gloeosporioides* 所引起之咖啡炭疽病。咖啡褐眼病及銹病目前並無推薦藥劑可用，且由於咖啡的栽植目前亦儘量推動不使用農藥的友善管理模式，因此尋求適當的有益微生物為重點工作之一，而植物內生菌的探索可能為解決方案之一。

本研究之目的有二，其一為瞭解台灣咖啡葉片內主要的內生真菌種類，以供未來有益微生物篩選之用；其二則是比較不同園區之內生炭疽菌的組成及出現頻度之差異，以瞭解其多樣性，做為未來咖啡病害及內生菌相關研究之參考資訊。

材料與方法

咖啡葉片內生真菌之分離與保存

內生真菌取樣及組織分離以 Oliveira *et al.* (2014) 之方法略加修飾後援用。自南投縣仁愛

鄉、雲林縣古坑鄉、嘉義縣中埔鄉及竹崎鄉、嘉義農業試驗分所、台南市東山區、台東縣泰武鄉等地區之 7 個咖啡園，每園按健康咖啡株數之比例隨機採樣 5–10 棵樹，取其植株成熟葉，每棵樹隨機取 4 片葉子，將樣本依序置於 75% 酒精中 30 s，再浸泡於 1% 次氯酸鈉進行表面消毒 3 min，繼而以無菌水 30 s 漂洗 3 次，續以滅菌擦手紙吸去多餘水分，並將植物葉片組織切成大小約 1 cm × 1 cm 小塊，每片葉片隨機切取 5 小片，置於以乳酸 (lactic acid) 酸化至 pH 3.8 之馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (acidified potato dextrose agar; APDA) [配製方法為以 750 μL 50% (v/v) 乳酸溶液加入 300 mL potato dextrose agar (PDA) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)]，於室溫下培養，待內生真菌自葉片組織內長出後，依形態分類記錄，7 d 記錄 1 次，記錄至 14 d。另外，切下菌絲尖端或單孢至 PDA 進行純化培養並保存於 10°C 下備用。各真菌之發生頻度的計算公式為：A 內生菌發生頻度 (%) = (由組織分離出 A 內生菌之葉片組織數/全部分離之葉片組織數) × 100%。南投仁愛、雲林古坑、嘉義分所、嘉義中埔、嘉義竹崎及台南東山之炭疽菌株以隨機方式抽樣 20–35% 之菌株進行後續分析。

內生菌種類鑑定

內生真菌鑑定方法，主要依據形態學與分子生物學。先觀察菌落形態特徵，待菌株產孢後，以孢子之形態等進行屬之鑑定 (Barnett & Hunter 1998)，若無產孢又為分離頻度高之真菌種類則進一步以 ribosomal ITS 片段之核苷酸序列進行分析。將待測菌株之培養菌絲以改進之 NaOH 簡易抽取植物 DNA 之方法進行 (Wang *et al.* 1993)。將所分離之病原菌培養於 PDA，待長出足量菌絲後，刮取少量菌絲，置於 200 μL 0.5 N NaOH 中，以手持式均質機均質約 1 min，再經離心去除其破碎菌絲殘體後，取上層液以 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 進行 10× 稀釋，所得稀釋液可作為 DNA 模板，進行 ITS 部分序列之增幅。本試驗所使用之 polymerase chain reaction (PCR) 溶液包含 1× PCR 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% (w/v) gelatin, 1%

Triton X-100]、100 μM dNTP, 0.4 U Prozyme DNA polymerase (Protech Technology Enterprise, Taipei, Taiwan) 以及 0.2 μM primer，並加入無菌水使其總體積為 25 μL。所使用之 PCR 引子對包括：用於增幅 ITS 序列之 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG G-3') 及 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.* 1990)。反應條件如下：94°C/4 min；接著以 94°C/30 s、52°C/30 s、72°C/30 s 進行 30 個循環；72°C/7 min，將增幅後 DNA 樣本與 EZ-vision DNA dye as loading buffer (Protech) 混合，以 1.5% Agarose gel 及 0.5× Tris/Borate/EDTA (TBE) 緩衝液進行核酸電泳分析。另外，所得 PCR 產物亦委託源資生物科技公司 (Tri-I Biotech Inc., Taipei, Taiwan) 進行核酸定序，定序後之核酸序列利用美國國家生物科技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information; NCBI) GenBank 資料庫進行序列查詢與比對。

咖啡葉片內生炭疽菌分子類緣鑑定

對收集之咖啡內生炭疽菌菌株，首先進行 intergenic region of Apn2 and MAT1-2-1 genes (ApMat) 及 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 基因片段之增幅，GAPDH 增幅之引子對為 GDF 及 GDR (Templeton *et al.* 1992)，ApMat 增幅之引子對為 AMF + AMR (Silva *et al.* 2012a)。以 GAPDH 或 ApMat 序列進行初步的菌株分群，再由不同分群中挑選菌株，進行 5 個基因序列串連的多基因類緣分析。多基因類緣分析所使用之基因片段包括 actin (ACT)、calmodulin (CAL)、chitin synthase (CHS)、GAPDH 以及 β-tubulin (TUB)，其中 ACT、CAL、CHS 及 TUB 基因片段增幅之引子對分別為 ACT-512F 及 ACT-783R (Carbone & Kohn 1999)、CL1C 及 CL2C (Weir *et al.* 2012)、CHS-79F 及 CHS-345R (Carbone & Kohn 1999)，以及 T1 (O'Donnell & Cigelnik 1997) 及 Bt2b (Glass & Donaldson 1995)。共同分析之菌株為參考 Weir *et al.* (2012) 及 Damm *et al.* (2012b) 所使用之菌株，並納入 2012 年後報告之炭疽新種菌株 (Manamgoda *et al.* 2013; Wang *et al.* 2016;

Sharma *et al.* 2017; De Silva *et al.* 2019)，將各菌株之序列 (表 1) 由 GenBank 資料庫下載後，與本研究之菌株基因序列 (表 2) 進行比較。各基因片段先以 ClustalX v.2.1 軟體 (Larkin *et al.* 2007) 進行相似度排列 (alignment) 後，以 jModeltest 進行 DNA 替換模型 (DNA substitution model) 最佳化預測，採用貝氏資訊準則方法 (Bayesian information criterion) 分析得到之 DNA 替換模型，套用於演化樹之建構。以 SequenceMatrix v.1.7.8 軟體 (Vaidya *et al.* 2011) 拼接各基因序列，並以 MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al.* 2012) 進行貝氏演算 (Bayesian inference; BI) 之樹型建構。進行 2 次分析，每次分析 1×10^7 個世代 (generation)，每 1,000 個世代取 1 棵分析，為求分析準確，捨棄前 25% 世代。

咖啡葉片内生炭疽真菌菌株形態觀察

將菌株之菌絲塊移植 PDA 平板進行 3–4 d 活化後，切取菌落邊緣至 PDA 或合成低營養瓊脂培養基 [synthetic nutrient-poor agar (SNA)，配製方法為 1 L 之培養基加入 6 g agar、1 g KH_2PO_4 、1 g KNO_3 、0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g KCl、0.2 g sucrose 及 0.2 g glucose] 上培養，在不照光之黑暗環境及 25°C 之條件培養 7 d。以移植環挑取菌落孢子置於載玻片上，以干涉位相差顯微鏡 [differential interference contrast (DIC), Nikon 80i, Nikon, Tokyo, Japan] 觀察孢子形態並拍照紀錄。附著器 (appressoria) 之觀察參考 Weir *et al.* (2012) 之方法並略加修改後援用，沾取炭疽菌培養於 SNA 上產生之孢子泥，以無菌水稀釋成 1×10^4 spores mL^{-1} 濃度之孢子液，將水瓊脂培養基 (water agar; WA) 切成邊長 1 cm 的方塊，置於滅菌過之載玻片上，於 WA 塊滴上 10 μL 孢子液，而後覆蓋滅菌之蓋玻片於 WA 塊上，將玻片放入保濕之玻璃培養皿中，黑暗中以 25°C 培養 3 d，之後將玻片取出，以干涉位相差顯微鏡觀察玻片上之附著器並量測附著器大小。

結果

咖啡葉片内生真菌種類及其分離率

分離 7 個咖啡園區之咖啡葉片内生真菌分，

初步經菌落外觀、產孢構造及 ITS 序列分子鑑定後，確認 *Colletotrichum* spp.、*Phyllosticta* spp. 及炭角菌科之真菌所占比例較高，由 7 個園一共分離到 859 株 *Colletotrichum* spp.、475 株 *Phyllosticta* spp.、505 株炭角菌科真菌及 214 株其他種類之真菌，分離之比例如表 3 所示，各園真菌分離之比例以 *Colletotrichum* spp. 較高，在 7 個果園 *Colletotrichum* spp. 均有 70% 以上的分離率，尤其在嘉義中埔及雲林古坑咖啡園分離率更高達 100%；而 *Phyllosticta* spp. 内生菌在 PDA 上呈現深墨綠色菌絲緊密之菌落 (圖 1A)，在不同咖啡園之間分離率差異大，南投仁愛及嘉義中埔之咖啡園未分離到 *Phyllosticta* spp.，但在嘉義分所咖啡園，分離率則有 77.6%；另外炭角菌科真菌則分離到 *Nemania* spp. 及 *Xylaria* spp.，此 *Xylaria* spp. 在 PDA 上呈放射狀白色菌落，菌絲在培養基上呈現明顯束狀 (圖 1B)，*Nemania* spp. 亦呈放射狀白色菌落，但菌絲呈束狀之情形較不明顯 (圖 1C)。炭角菌科真菌在 7 個咖啡園均有 20% 以上的分離率，其中在嘉義中埔咖啡園分離率更達到 92%。其他零星分離到之真菌，包含 *Alternaria* spp.、*Cladosporium* spp.、*Fusarium* spp.、*Lasiodiplodia* spp.、*Pestalotia* spp. 及 *Phomopsis* spp. 等，僅在部分咖啡園分離得到，其中僅有 *Pestalotia* spp. 在台南東山咖啡園分離比例較高，為 26%，其餘真菌之分離率皆不超過 5%。*Colletotrichum* spp.、*Phyllosticta* spp. 及炭角菌科真菌除了在咖啡葉片上的分離率高之外，同一片葉子上亦常共存 2 種或 2 種以上的内生真菌。

以 GAPDH 或 ApMat 基因片段初步將咖啡葉内生炭疽菌分群

由南投仁愛、雲林古坑、嘉義分所、嘉義中埔、嘉義竹崎及台南東山等園共收集 147 株菌，初步以 ApMat 或 GAPDH 序列分析，結果顯示大多數炭疽菌株屬於 *C. gloeosporioides* 複合種，僅有由嘉義竹崎分離結果有數個菌株屬於 *C. boninense* 複合種。以本土 147 株炭疽菌 (表 2) 合併由 GenBank 擷取隸屬於 *C. gloeosporioides* 複合種之炭疽菌 (表 1) 中 28 個物種，應用 ApMat 基因片段序列以最大似

表 1. 本研究所用炭疽菌菌株的來源國家、寄主及 GenBank 編號。
Table 1. List of *Colletotrichum* isolates used in this study with the country, host and GenBank accession number.

Species	Culture ^a	Host	Country	GenBank accession number ^b					
				GAPDH	CAL	ACT	CHS-1	TUB	
Isolates used in <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> species complex tree									
<i>Colletotrichum aenigma</i>	ICMP 18608	<i>Persea americana</i>	Israel	JX010044	JX009683	JX009443	JX009774	JX010389	
<i>Colletotrichum aeshynomenes</i>	ICMP 17673	<i>Aeschynomene virginica</i>	USA	JX009930	JX009721	JX009483	JX009799	JX010392	
<i>Colletotrichum alatae</i>	ICMP 17919; CBS 304.67	<i>Dioscorea alata</i>	India	JX009990	JX009738	JX009471	JX009837	JX010383	
<i>Colletotrichum alienum</i>	ICMP 12071	<i>Malus domestica</i>	New Zealand	JX010028	JX009654	JX009572	JX009882	JX010411	
<i>Colletotrichum aotearoa</i>	ICMP 18537	<i>Coprosma</i> sp.	New Zealand	JX010005	JX009611	JX009564	JX009853	JX010420	
	ICMP 18530	<i>Vitex lucens</i>	New Zealand	JX009911	JX009623	JX009521	JX009884	JX010419	
	ICMP 18535	<i>Dacrydium dacrydioides</i>	New Zealand	JX009968	JX009617	JX009545	JX009766	JX010423	
<i>Colletotrichum astanum</i>	ICMP 18696	<i>Mangifera indica</i>	Australia	JX009915	JX009723	JX009576	JX009753	JX010384	
	ICMP 18605	<i>Mangifera indica</i>	Thailand	JX010021	JX009726	JX009465	JX009787	-	
	ICMP 18580; CBS 130418	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	JX010053	F1917506	JX009584	JX009867	JX010406	
<i>Colletotrichum boninense</i> (used as an out-group)	ICMP 17904; CBS 123755	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japan	JX009905	HM582004	JX009583	JX009827	-	
<i>Colletotrichum clidemiae</i>	ICMP 18658	<i>Clidemia hirta</i>	USA, Hawaii	JX009989	JX009645	JX009537	JX009877	JX010438	
<i>Colletotrichum cordylinicola</i>	ICMP 18579	<i>Cordylone fruticosa</i>	Thailand	JX009975	HM470238	HM470235	JX009864	JX010440	
<i>Colletotrichum endophyticum</i>	CAUG28	<i>Capsicum annuum</i>	China	KPI45413	KPI45357	KPI45329	KPI45385	KPI45469	
<i>Colletotrichum endophyticum</i>	UOM 1137	<i>Capsicum annuum</i>	Thailand	MH707467	-	MH781483	MH805853	MH846566	
<i>Colletotrichum fructicola</i>	ICMP 12568	<i>Persea americana</i>	Australia	JX009946	JX009680	JX009529	JX009762	-	
	ICMP 18613	<i>Limonium sinuatum</i>	Israel	JX009998	JX009675	JX009491	JX009772	JX010388	
	ICMP 18610	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Japan	JX010034	JX009681	JX009526	JX009788	-	
	ICMP 18581	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	JX010033	F1917508	F1907426	JX009866	JX010405	
<i>C. fructicola</i> (syn. <i>Colletotrichum ignotum</i>)	ICMP 18646; CBS 125397	<i>Tetragastris panamensis</i>	Panama	JX010032	JX009674	JX009581	JX009874	JX010409	
<i>C. fructicola</i> (syn. <i>Glomerella cingulata</i> var. <i>minor</i>)	ICMP 17921; CBS 238.49	<i>Ficus edulis</i>	Germany	JX009923	JX009671	JX009495	JX009839	JX010400	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	ICMP 17821	<i>Citrus sinensis</i>	Italy	JX010056	JX009731	JX009531	JX009818	JX010445	

表 1. 本研究所用炭疽菌株的來源國家、寄主及 GenBank 編號。(續)

Species	Culture ^z	Host	Country	GenBank accession number ^y					
				GAPDH	CAL	ACT	CHS-1	TUB	
<i>C. gloeosporioides</i> (syn. <i>Gloeosporium pedemontanum</i>)	ICMP 19121; CBS 273.51	<i>Citrus limon</i>	Italy	JX010054	JX009745	JX009558	JX009903	-	
<i>Colletotrichum hippeastrum</i> (used as an out-group)	ICMP 17920; CBS 241.78	<i>Hippeastrum</i> sp.	Netherlands	JX009932	JX009740	JX009485	JX009838	-	
<i>Colletotrichum horii</i>	ICMP 10492	<i>Diospyros kaki</i>	Japan	GQ329681	JX009604	JX009438	JX009752	JX010450	
<i>Colletotrichum jiangxiense</i>	CGMCC 3.17363; LF687	<i>Camellia sinensis</i>	China	KJ954902	KJ954752	KJ954471	-	KJ955348	
<i>Colletotrichum kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	ICMP 18539	<i>Olea europaea</i>	Australia	JX009966	JX009635	JX009523	JX009800	JX010434	
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i> (syn. <i>Glomerella cingulata</i> var. <i>migrans</i>)	ICMP 17922	<i>Hypericum perforatum</i>	Germany	JX010042	JX009636	JX009450	JX009840	JX010432	
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i> (syn. <i>Glomerella rufomaculans</i> var. <i>vaccinii</i>)	ICMP 19122; CBS 124.22	<i>Vaccinium</i> sp.	USA	JX009950	JX009744	JX009536	JX009902	JX010433	
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>kahawae</i>	ICMP 17816	<i>Coffea arabica</i>	Kenya	JX010012	JX009642	JX009452	JX009813	JX010444	
<i>Colletotrichum makassarense</i>	CBS 143664	<i>Capsicum annuum</i>	Indonesia	MH728820	-	MH781480	MH805850	MH846563	
<i>Colletotrichum musae</i>	ICMP 19119; CBS 116870	<i>Musa</i> sp.	USA	JX010050	JX009742	JX009433	JX009896	HQ596280	
<i>Colletotrichum nupharicola</i>	ICMP 17938; CBS 469.96	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	USA	JX009936	JX009661	JX009486	JX009834	JX010397	
<i>Colletotrichum perseae</i>	GA100	<i>Persea americana</i>	Israel	KX620242	KX620206	KX620145	-	KX620341	
<i>Colletotrichum psidii</i>	ICMP 19120; CBS 145.29	<i>Psidium</i> sp.	Italy	JX009967	JX009743	JX009515	JX009901	JX010443	
<i>Colletotrichum queenslandicum</i>	ICMP 1778	<i>Carica papaya</i>	Australia	JX009934	JX009691	JX009447	JX009899	JX010414	
<i>Colletotrichum salsolae</i>	ICMP 19051	<i>Salsola tragus</i>	Hungary	JX009916	JX009696	JX009562	JX009863	JX010403	
<i>Colletotrichum siamense</i>	ICMP 12565	<i>Persea americana</i>	Australia	JX009937	JX009698	JX009571	JX009760	-	
	ICMP 18121	<i>Dioscorea rotundata</i>	Nigeria	JX009942	JX009715	JX009460	JX009845	JX010402	
	ICMP 18739	<i>Carica papaya</i>	South Africa	JX009921	JX009716	JX009484	JX009794	-	
	ICMP 18578	<i>Coffea arabica</i>	Thailand	JX009924	FJ917505	FJ907423	JX009865	JX010404	
<i>C. siamense</i> (syn. <i>C. hymenocallidis</i>)	ICMP 18642; CBS 125378	<i>Hymenocallis americana</i>	China	JX010019	JX009709	GQ856775	GQ856730	JX010410	

表 1. 本研究使用炭疽菌菌株的來源國家、寄主及 GenBank 編號。(續)

Species	Culture ^z	Host	Country	GenBank accession number ^y					
				GAPDH	CAL	ACT	CHS-1	TUB	
<i>C. siamense</i> (syn. <i>C. jasmini-sambac</i>)	ICMP 19118; CBS 130420	<i>Jasminum sambac</i>	Vietnam	HM131497	JX009713	HM131507	JX009895	JX010415	
<i>Colletotrichum tainanense</i>	CBS 143666	<i>Capsicum annuum</i>	Taiwan	MH728823	-	MH781475	MH805845	MH846558	
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	UOM 1119 ICMP 18649; CBS 124945	<i>Capsicum annuum</i> <i>Theobroma cacao</i>	Taiwan Panama	MH728819 JX010006	- JX009591	MH781487 JX009444	MH805857 JX009869	MH846570 JX010447	
<i>C. theobromicola</i> (syn. <i>C. fragariae</i>)	ICMP 17927; CBS 142.31	<i>Fragaria × ananassa</i>	USA	JX010024	JX009592	JX009516	JX009830	JX010373	
<i>C. theobromicola</i> (syn. <i>C. gloeosporioides</i> f. <i>stylosanthis</i>)	ICMP 17957; CBS 124251	<i>Stylosanthes viscosa</i>	Australi	JX009962	JX009597	JX009575	JX009821	JX010380	
<i>Colletotrichum ti</i>	ICMP 4832	<i>Cordyline</i> sp.	New Zealand	JX009952	JX009649	JX009520	JX009898	JX010442	
<i>Colletotrichum tropicale</i>	ICMP 18672 ICMP 18653; CBS 124949	<i>Litchi chinensis</i> <i>Theobroma cacao</i>	Japan Panama	JX010020 JX010007	JX009722 JX009719	JX009480 JX009489	JX009826 JX009870	JX010396 JX010407	
<i>Colletotrichum wuxiense</i>	ICMP 18651	<i>Annona muricata</i>	Panama	JX010014	JX009720	JX009570	JX009868	-	
<i>Colletotrichum xanthorrhoeae</i>	CGMCC 3.17894 ICMP 17903; CBS 127831	<i>Camellia sinensis</i> <i>Xanthorrhoea preissii</i>	China Australia	KU252045 JX009927	KU251833 JX009653	KU251672 JX009478	KU251939 JX009823	KU252200 JX010448	
<i>Glomerella cingulata</i> "f.sp. <i>Camelliae</i> "	ICMP 18542	<i>Camellia sasanqua</i>	USA	JX009994	JX009628	JX009488	JX009857	JX010429	
Isolates used in <i>Colletotrichum boninense</i> species complex tree									
<i>Colletotrichum annellatum</i>	CBS129826	<i>Hevea brasiliensis</i>	Colombia	JQ005309	JQ005743	-	-	JQ005656	
<i>Colletotrichum beeveri</i>	CBS128527; ICMP 18594	<i>Brachyglottis repanda</i>	New Zealand	JQ005258	JQ005692	-	-	JQ005605	
<i>Colletotrichum boninense</i>	CBS123755	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japan	JQ005240	JQ005674	-	-	JQ005588	
	CBS128526; ICMP 18591	<i>Dacrydium dacrydioides</i>	New Zealand	JQ005249	JQ005683	-	-	JQ005596	
	CBS128547; ICMP 10338	<i>Camellia</i> sp.	New Zealand	JQ005246	JQ005680	-	-	JQ005593	

表 1. 本研究所用炭疽菌菌株的來源國家、寄主及 GenBank 編號。(續)

Species	Culture ^z	Host	Country	GenBank accession number ^y					
				GAPDH	CAL	ACT	CHS-1	TUB	
<i>Colletotrichum brasiliense</i>	CBS128501; ICMP 18607	<i>Passiflora edulis</i>	Brazil	JQ005322	JQ005756	-	-	JQ005669	
<i>Colletotrichum brassicicola</i>	CBS101059	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gem-mifera</i>	New Zealand	JQ005259	JQ005693	-	-	JQ005606	
<i>Colletotrichum colombiense</i>	CBS129818	<i>Passiflora edulis</i>	Colombia	JQ005261	JQ005695	-	-	JQ005608	
<i>Colletotrichum constrictum</i>	CBS128504; ICMP 12941	<i>Citrus limon</i>	New Zealand	JQ005325	JQ005759	-	-	JQ005672	
<i>Colletotrichum cymbidicola</i>	IMI347923	<i>Cymbidium</i> sp.	Australia	JQ005253	JQ005687	-	-	JQ005600	
<i>Colletotrichum dacrycarpi</i>	CBS123757 CBS130241; ICMP 19107	<i>Cymbidium</i> sp. <i>Dacrycarpus dacrytoides</i>	Japan New Zealand	JQ005255 JQ005323	JQ005689 JQ005757	-	-	JQ005602 JQ005670	
<i>C. gloeosporioides</i> (used as an outgroup)	CBS112999	<i>Citrus sinensis</i>	Italy	JQ005239	JQ005673	-	-	JQ005587	
<i>Colletotrichum hippaeatri</i>	CBS125376	<i>Hippeastrum vittatum</i>	China	JQ005318	JQ005752	-	-	JQ005665	
<i>Colletotrichum karstii</i>	CBS129833	<i>Musa</i> sp.	Mexico	JQ005262	JQ005696	-	-	JQ005609	
	CBS110779	<i>Eucalyptus grandis</i>	South Africa	JQ005285	JQ005719	-	-	JQ005632	
	CBS127552	<i>Eugenia uniflora</i>	Brazil	JQ005304	JQ005738	-	-	JQ005651	
	CBS106.91	<i>Carica papaya</i>	Brazil	JQ005307	JQ005741	-	-	JQ005654	
<i>Colletotrichum novae-Zelandiae</i>	CBS128505	<i>Capsicum annuum</i>	New Zealand	JQ005315	JQ005749	-	-	JQ005662	
<i>Colletotrichum oncidii</i>	CBS129828	<i>Oncidium</i> sp.	Germany	JQ005256	JQ005690	-	-	JQ005603	
<i>Colletotrichum parsoniae</i>	CBS128525	<i>Parsonsia capsularis</i>	New Zealand	JQ005320	JQ005754	-	-	JQ005667	
<i>Colletotrichum petchii</i>	CBS125957	<i>Dracaena</i>	Netherlands	JQ005313	JQ005747	-	-	JQ005660	
	CBS378.94	<i>Dracaena marginata</i>	Italy	JQ005310	JQ005744	-	-	JQ005657	
<i>Colletotrichum phyllanthi</i>	CBS175.67	<i>Phyllanthus acidus</i>	India	JQ005308	JQ005742	-	-	JQ005655	
<i>Colletotrichum torulosum</i>	CBS128544; ICMP 18586	<i>Solanum melongena</i>	New Zealand	JQ005251	JQ005685	-	-	JQ005598	

^z ICMP: International Collection of Microorganisms from Plant, Landcare Research, Auckland, New Zealand; CBS: CBS-KNAW, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht Netherlands; IMI: culture collection of CABI Europe UK centre, Egham, UK.

^y ACT: actin gene; CAL: calmodulin gene; CHS: chitin synthetase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; TUB: β -tubulin.

表 2 本研究由台灣咖啡葉內生炭疽菌菌株分離之來源地及其 GenBank 號碼。
Table 2. List of endophytic *Colletotrichum* spp. from coffee leaves in Taiwan with the location and GenBank accession number.

Species	Isolate	Location	GenBank accession number ^z					
			ACT	CAL	CHS	GAPDH	ApMat	TUB
Isolates used in <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> species complex tree								
<i>Colletotrichum cordylinicola</i>	Col-1817	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ438710	MZ488282	MZ457423	MZ457440	MZ543979	MZ509114
	Col-1844	Gukeng Township, Yunlin County	MZ438711	MZ488283	MZ457424	MZ457441	MZ543980	MZ509115
	Col-1923	Dongshan District, Tainan City	MZ438712	MZ488284	MZ457425	MZ457442	MZ543981	MZ509116
	Col-2145	Ren-ai Township, Nantou County	MZ438713	MZ488285	MZ457426	MZ457443	MZ543982	-
	Col-2147	Ren-ai Township, Nantou County	MZ438714	MZ488286	MZ457427	MZ457444	MZ543983	-
	Col-2206	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ543988	MZ568788	MZ543990	MZ568793	MZ576496	-
<i>Colletotrichum fructicola</i>	Col-1925	Dongshan District, Tainan City	MZ438715	MZ488287	MZ457428	MZ457445	MZ543984	MZ509117
	Col-1928	Chiayi Agricultural Experiment Station	MZ438716	MZ488288	MZ457429	MZ457446	MZ543985	MZ509118
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Col-2257	(Shizhuo) Zhuqi Township, Chiayi County	MZ438717	MZ488289	MZ457430	MZ457447	MZ543986	-
<i>Colletotrichum jiangxiense</i>	Col-2241	(Shizhuo) Zhuqi Township, Chiayi County	MZ438718	MZ488290	MZ457431	MZ457448	MZ543987	MZ576491
	Col-1818	Gukeng Township, Yunlin County	MZ438719	MZ488291	MZ457432	MZ457449	MZ568779	MZ509119
<i>Colletotrichum siamense</i>	Col-1819	Gukeng Township, Yunlin County	MZ438720	MZ488292	MZ457433	MZ457450	MZ568780	MZ509120
	Col-1834	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ438721	MZ488293	MZ457434	MZ457451	MZ568781	-
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	Col-1924	Dongshan District, Tainan City	MZ438722	MZ488294	MZ457435	MZ457452	MZ568782	-
	Col-1929	Chiayi Agricultural Experiment Station	MZ438723	MZ488295	MZ457436	MZ457453	MZ568783	-
<i>Colletotrichum tropicale</i>	Col-1905	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ438724	MZ488296	MZ457437	MZ457454	MZ568784	MZ509121
	Col-2201	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ543989	MZ568789	MZ543999	MZ568794	MZ576497	-
<i>Colletotrichum sp.</i>	Col-2165	Ren-ai Township, Nantou County	MZ438725	MZ488297	-	MZ457455	MZ568785	MZ576492
	Col-1836	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ438726	MZ488298	MZ457438	MZ457456	MZ568786	MZ509122
Isolates used in <i>Colletotrichum boninense</i> species complex tree	Col-1837	Jhongpu Township, Chiayi County	MZ438727	MZ488299	MZ457439	MZ457457	MZ568787	MZ509123
	Col-2258	(Shizhuo) Zhuqi Township, Chiayi County	-	MZ568790	-	MZ568795	-	MZ576493
<i>Colletotrichum karstii</i>	Col-2247	(Shizhuo) Zhuqi Township, Chiayi County	-	MZ568791	-	MZ568796	-	MZ576494
	Col-2260	(Shizhuo) Zhuqi Township, Chiayi County	-	MZ568792	-	MZ568797	-	MZ576495

^z ACT: actin gene; ApMat: intergenic region of Apn2 and MAT1-2-1 genes; CAL: calmodulin gene; CHS: chitin synthetase; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ITS: the ribosomal internal transcribed spacer; TUB: β -tubulin.

表 3. *Colletotrichum* spp.、*Phyllosticta* spp. 及炭角菌科 (Xylariaceae) 真菌等內生真菌在 7 個不同地區咖啡園之咖啡葉中之分離頻度。

Table 3. The isolation frequency of coffee endophyte including *Colletotrichum* spp., *Phyllosticta* spp. and Xylariaceae fungi, from coffee leaves from seven coffee orchards in different areas.

Collection site	Isolation frequency (%) ²			
	<i>Colletotrichum</i> spp.	<i>Phyllosticta</i> spp.	Xylariaceae fungi	Other fungi
Ren-ai Township, Nantou County	97.9	0.0	22.1	5.7
Gukeng Township, Yunlin County	100.0	60.0	33.0	5.0
Chiayi Agricultural Experiment Station	76.8	77.6	78.8	25.6
Jhongpu Township, Chiayi County	100.0	0.0	92.0	13.0
(Shizhuo) Zhuqi Township, Chiayi County	76.0	63.0	31.0	28.0
Dongshan District, Tainan City	76.0	40.0	72.0	37.0
Taiwu Township, Pingtung County	89.0	59.0	24.5	29.5

² Isolation frequency (%): the number of leaf discs from which the fungi was isolated/total leaf discs investigated.

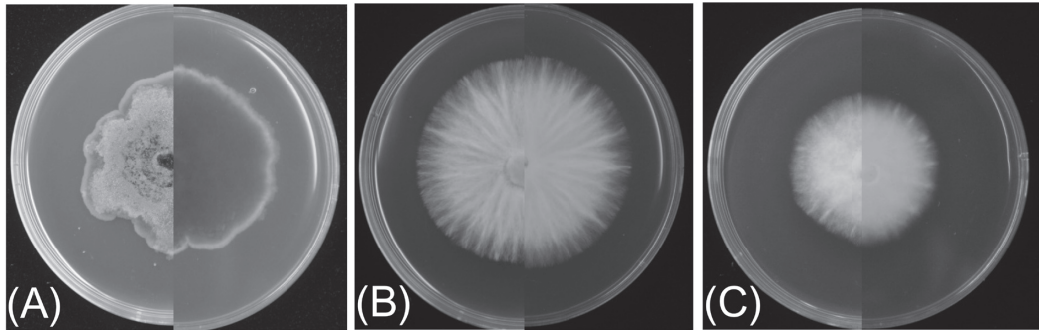


圖 1. 咖啡葉分離到之內生真菌 (A) *Phyllosticta* spp.、(B) *Nemanina* spp. 及 (C) *Xylaria* spp. 在馬鈴薯瓊脂培養基上的菌落型態。(A–C) 左半部為菌落正面照，右半部為菌落背面照。

Fig. 1. Colony morphology on potato dextrose agar. (A) *Phyllosticta* spp., (B) *Nemanina* spp. and (C) *Xylaria* spp. For (A–C), the left side is the upper surface of the colony, and the right side is the reverse.

然性演算法 (maximum likelihood; ML) 進行分析。結果顯示，本研究之菌株可劃分成 12 個分支 (圖 2)，其中 C1–C3 分支與 *C. siamense* 接近，C4 為獨立的分支，包含 Col-1836、Col-1837 及 Col-2217，以 C4 分支 3 株菌的 ApMat 序列於 NCBI 網站進行 nBLAST 比對，最接近的已知種序列為 *C. siamense* ZLY3 菌株 (GenBank accession no. MT602136)，但其相似度僅有 93.3%。C5 分支包含數個已知為 *C. fructicola* 的菌株序列，C6 分支則包含 *C. tropicale*。C7 僅含 1 菌株 Col-2257，與 *C. gloeosporioides* 最接近。C8 亦為獨立分支，含 11 個菌株。C9 則與 *Colletotrichum kahawae* subsp.

kahawae ICMP17816 以及 *Colletotrichum jiangxiense* CGMCC3.17363 劃為同一分支。C10 及 C11 與 *Colletotrichum cordylinicola* 劃在同一分支下，C12 分支則與 *C. theobromicola* 接近。

咖啡葉内生炭疽菌多基因類緣分析

為進一步確認 C1–C12 分支之菌株種類，由各分支挑選 1–3 株菌，進行 ACT、CAL、CHS、GAPDH 及 TUB 串聯的多基因分子進行 BI 法類緣鑑定 (圖 3)。結果顯示，屬於 C1 分支的 Col-1929、Col-1834，屬於 C2 分支的 Col-1819 以及屬於 C3 分支的 Col-1818、Col-

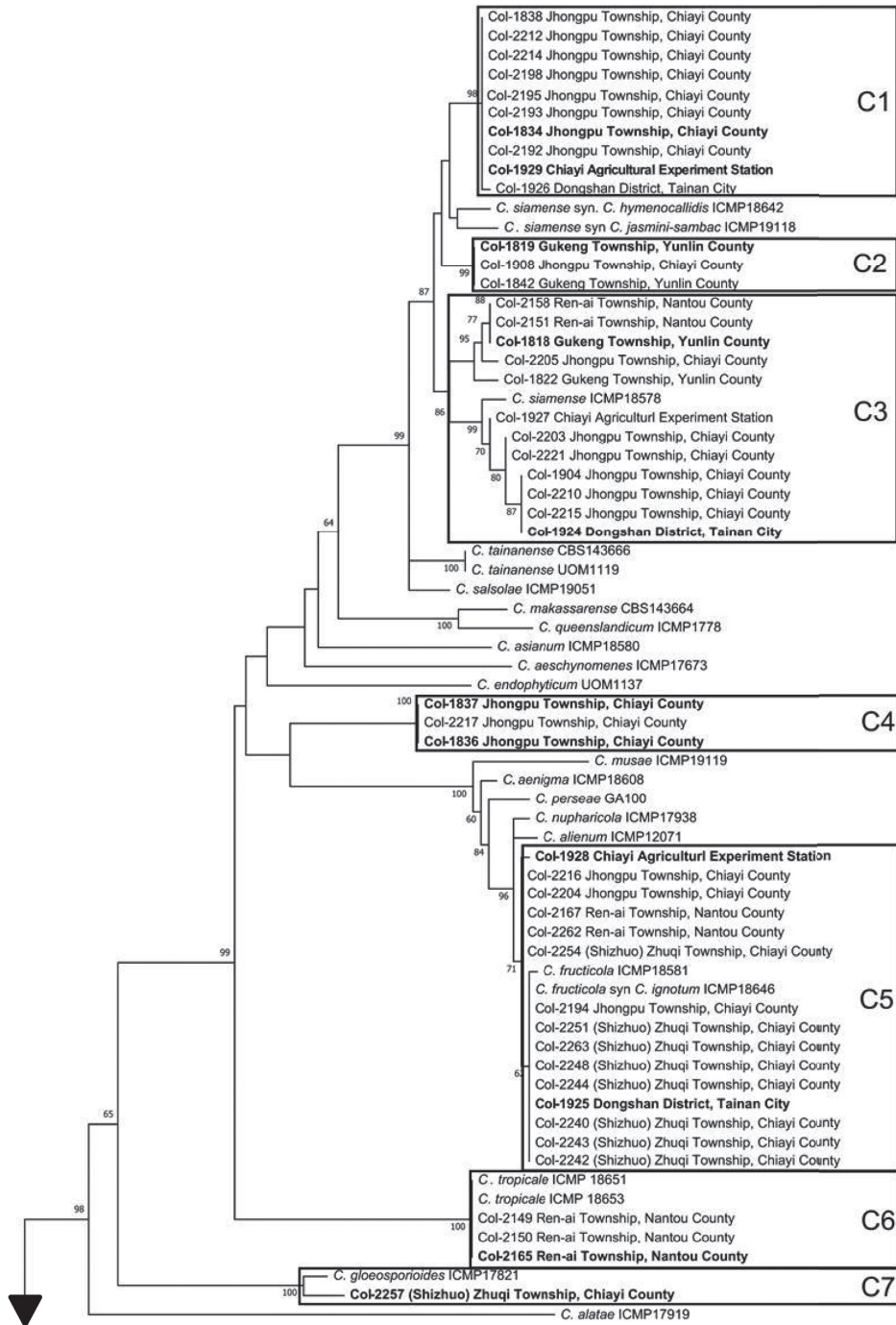


圖 2. 以 intergenic region of Apn2 and MAT1-2-1 序列及 maximum likelihood 演算法分析咖啡葉內生炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.) 的種類，並將其區分為 C1-C12 分支。粗體字表示之菌株為後續進行多基因類緣分析之菌株。

Fig. 2. Coffee endophytic *Colletotrichum* phylogenetic analysis based on intergenic region of Apn2 and MAT1-2-1 sequences using maximum likelihood algorithm. These isolates formed C1-C12 clades. Isolates used in sequential multi-locus phylogenetic analysis were emphasized in bold.

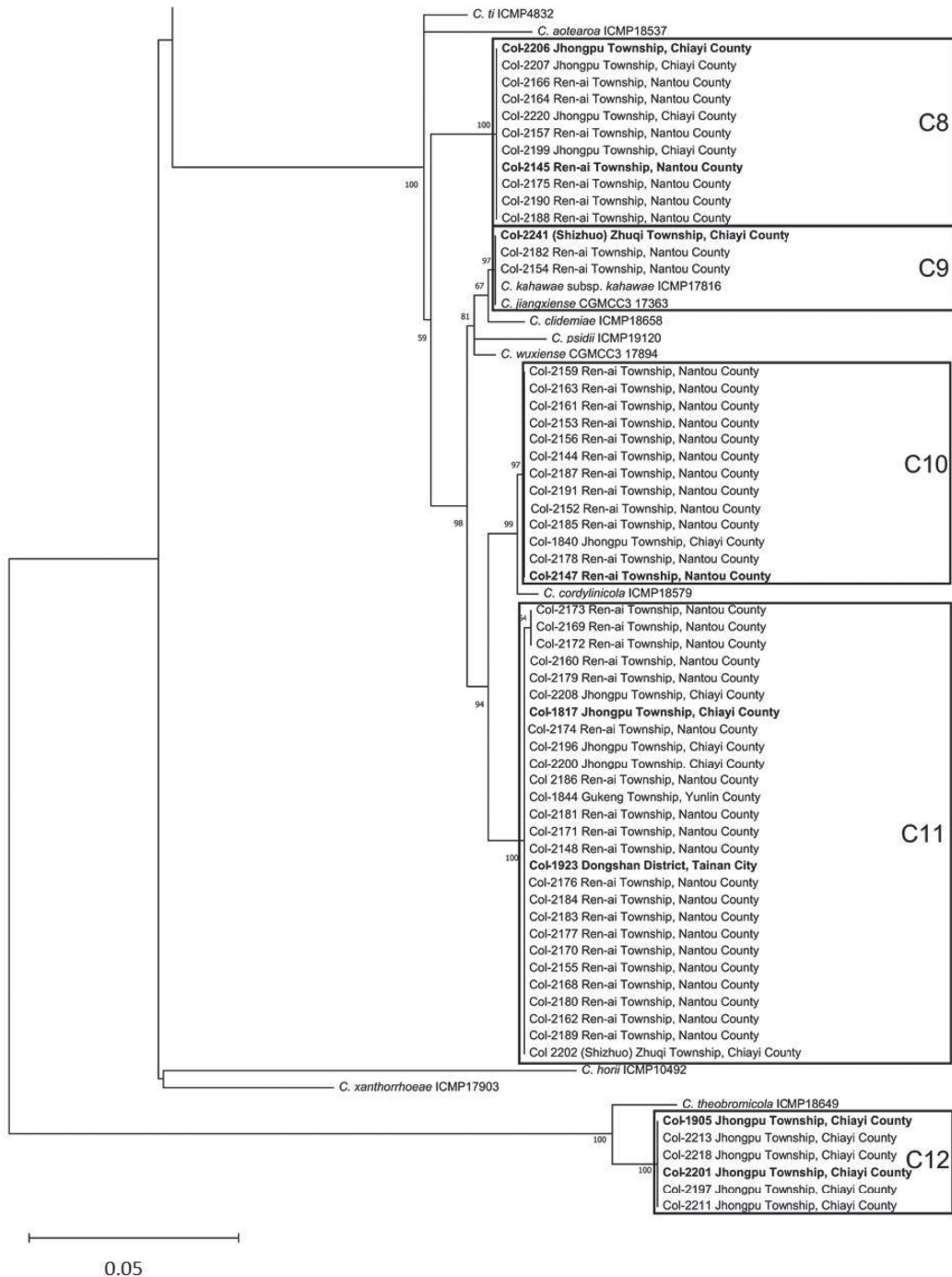


圖 2. 以 intergenic region of Apn2 and MAT1-2-1 序列及 maximum likelihood 演算法分析咖啡葉內生炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.) 的種類，並將其區分為 C1-C12 分支。粗體字表示之菌株為後續進行多基因類緣分析之菌株。(續)

Fig. 2. Coffee endophytic *Colletotrichum* phylogenetic analysis based on intergenic region of Apn2 and MAT1-2-1 sequences using maximum likelihood algorithm. These isolates formed C1-C12 clades. Isolates used in sequential multi-locus phylogenetic analysis were emphasized in bold. (continued)

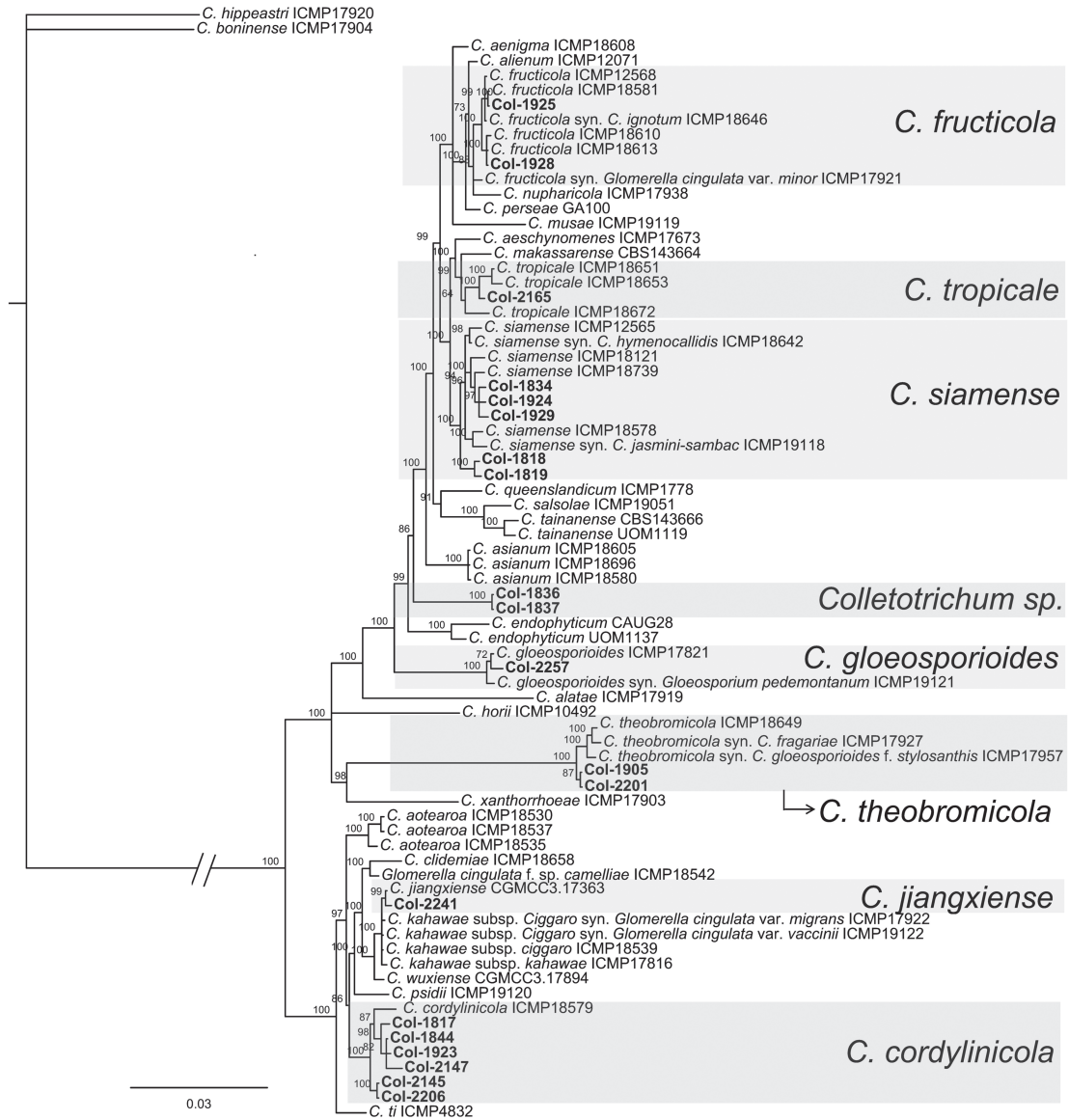


圖 3. 以 actin、calmodulin、chitin synthase、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 及 β -tubulin 基因片段對咖啡葉內生炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 複合種以貝氏演算法進行多基因類緣分析之結果。粗體字表示之菌株為本研究之咖啡炭疽內生菌之菌株。

Fig. 3. Multi-locus phylogenetic analysis for *Colletotrichum gloeosporioides* complex in coffee leaves using Bayesian inference analysis, which is based on actin, calmodulin, chitin synthase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -tubulin sequences. Isolates in this study were emphasized in bold.

1924 皆為 *C. siamense*，顯示 C1–C3 分支為 *C. siamense*。C4 分支的 Col-1836 及 Col-1837 則在多基因類緣分析中亦獨立形成 1 個分支，顯示 C4 分支可能為新種。C5 分支下的 Col-1925 及 Col-1928 為 *C. fructicola*，顯示 C5 為 *C.*

fructicola。經由 Col-2165 分析結果可知 C6 分支為 *C. tropicale*。C7 分支下的 Col-2257 為 *C. gloeosporioides*。C8 分支下的 Col-2145、C10 分支 Col-2147 以及 C11 分支下的 Col-1817、Col-1844 及 Col-1923 皆為 *C. cordylinicola*，

顯示 C8、C10 及 C11 為 *C. cordylinicola*。屬於 C9 分支的 Col-2241 則為 *C. jianxiense*。C12 分支下的 Col-1905 則屬於 *C. theobromicola*。

咖啡葉内生炭疽菌除了包含前述 *C. gloeosporioides* 複合種下的 7 個已知種及 1 個可能的新種外，在嘉義竹崎之咖啡園還發現多株 *C. boninense* 複合種之菌株。依據 GAPDH 序列之差異，取 Col-2248、Col-2258 及 Col-2260 菌株，經 ACT、GAPDH 及 CAL 多基因類緣分析，發現 Col-2258 為 *C. boninense*，Col-2247 及 Col-2260 則為 *C. karstii* (圖 4)。

咖啡葉内生炭疽菌型態觀察

本研究經由上述多基因類緣分析之 10 種咖啡葉内生炭疽菌，進行菌落及孢子型態觀察，結果如圖 5、圖 6 所示。就菌落型態而言，*C. gloeosporioides* 複合種中，大部分培養菌落為正面白色或淺灰色，背面則呈現淺黃、橘色或灰色 (圖 5 之菌落型態及圖 6A、E、I)，較特別的為 *C. fructicola* 分離株 Col-1928 在 PDA 上無論正反面都呈現深灰色 (圖 5I)，此種菌落型態亦出現在部分 *C. cordylinicola* 菌株上 (資料未顯示)，此外，部分 *C. cordyli-*

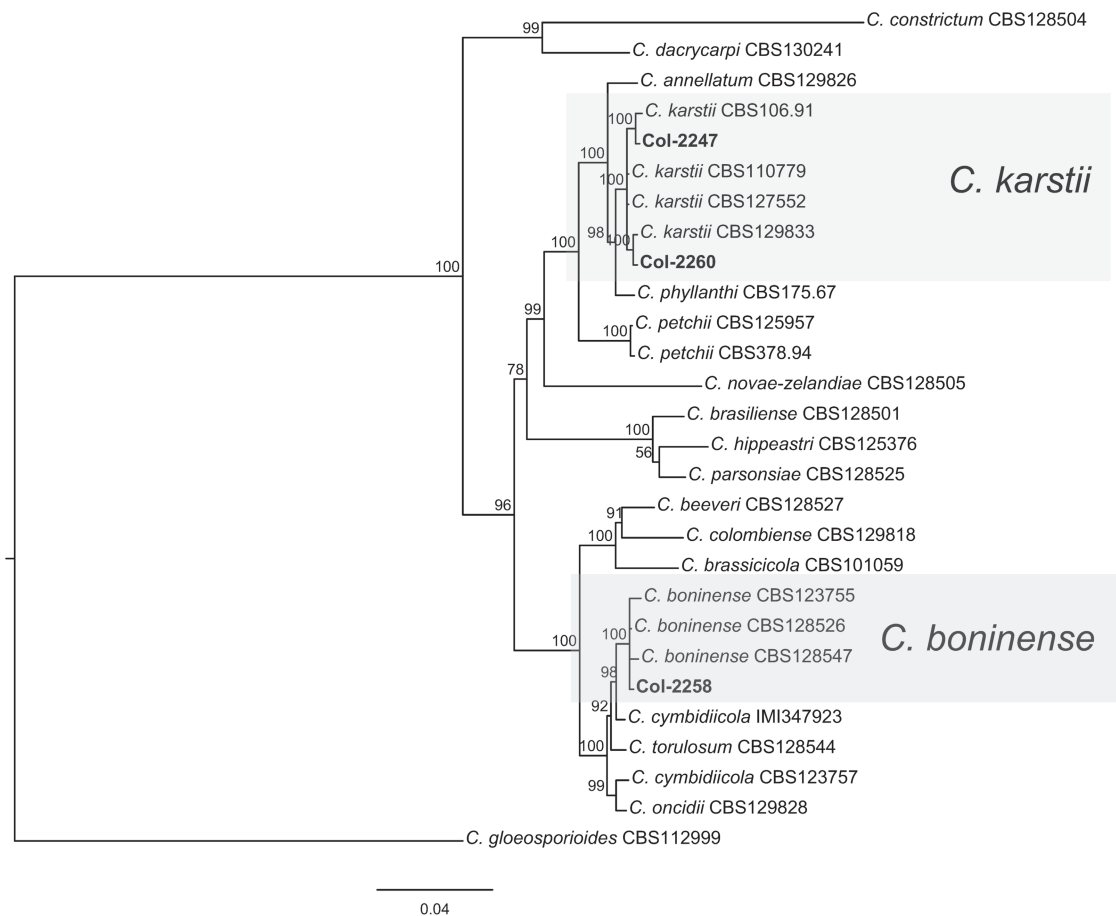


圖 4. 以 calmodulin、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 及 β -tubulin 基因片段對咖啡葉内生炭疽菌 *Colletotrichum boninense* 複合種以貝氏演算法進行多基因類緣分析之結果。粗體字表示之菌株為本研究之咖啡炭疽内生菌之菌株。

Fig. 4. Multi-locus phylogenetic analysis for *Colletotrichum boninense* complex in coffee leaves using Bayesian inference analysis, which is based on calmodulin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and β -tubulin sequences. Isolates in this study were emphasized in bold.

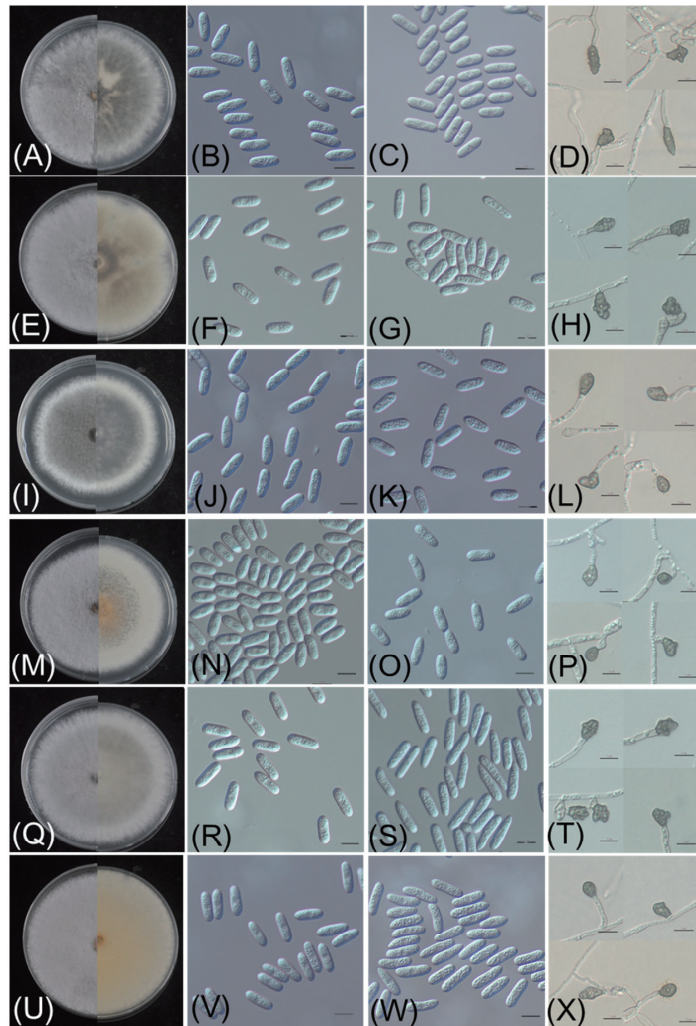


圖 5. 咖啡葉內生炭疽菌之型態。 *Colletotrichum cordylinicola* Col-1844 菌株 (A) 在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (PDA) 之菌落型態；(B) 在合成低營養瓊脂培養基 (SNA) 上之孢子型態；(C) 在 PDA 上孢子型態及 (D) 附著器型態。 *Colletotrichum cordylinicola* Col-2145 菌株 (E) 在 PDA 之菌落型態；(F) 在 SNA 上之孢子型態；(G) 在 PDA 上孢子型態及 (H) 附著器型態。 *Colletotrichum fructicola* Col-1928 菌株 (I) 在 PDA 之菌落型態；(J) 在 SNA 上之孢子型態；(K) 在 PDA 上孢子型態及 (L) 附著器型態。 *Colletotrichum gloeosporioides* Col-2257 菌株 (M) 在 PDA 之菌落型態；(N) 在 SNA 上之孢子型態；(O) 在 PDA 上孢子型態及 (P) 附著器型態。 *Colletotrichum jiangxiense* Col-2241 菌株 (Q) 在 PDA 之菌落型態；(R) 在 SNA 上之孢子型態；(S) 在 PDA 上孢子型態及 (T) 附著器型態。 *Colletotrichum siamense* Col-1834 菌株 (U) 在 PDA 之菌落型態；(V) 在 SNA 上之孢子型態；(W) 在 PDA 上孢子型態及 (X) 附著器型態。(A)、(E)、(I)、(M)、(Q) 及 (U) 左半部為菌落正面照，右半部為菌落背面照。比例尺 = 10 μ m。

Fig. 5. Morphology of coffee endophytic *Colletotrichum* species. *Colletotrichum cordylinicola* isolate Col-1844 (A) colony on potato dextrose agar (PDA); (B) conidia on synthetic nutrient-poor agar (SNA); (C) conidia on PDA and (D) appressoria. *Colletotrichum cordylinicola* isolate Col-2145 (E) colony on PDA; (F) conidia on SNA; (G) conidia on PDA and (H) appressoria. *Colletotrichum fructicola* isolate Col-1928 (I) colony on PDA; (J) conidia on SNA; (K) conidia on PDA and (L) appressoria. *Colletotrichum gloeosporioides* isolate Col-2257 (M) colony on PDA; (N) conidia on SNA; (O) conidia on PDA and (P) appressoria. *Colletotrichum jiangxiense* Col-2241 (Q) colony on PDA; (R) conidia on SNA; (S) conidia on PDA and (T) appressoria. *Colletotrichum siamense* isolate Col-1834 (U) colony on PDA; (V) conidia on SNA; (W) conidia on PDA and (X) appressoria. For (A), (E), (I), (M), (Q) and (U), the left side is the upper surface of the colony, and the right side is the reverse. Bar = 10 μ m.

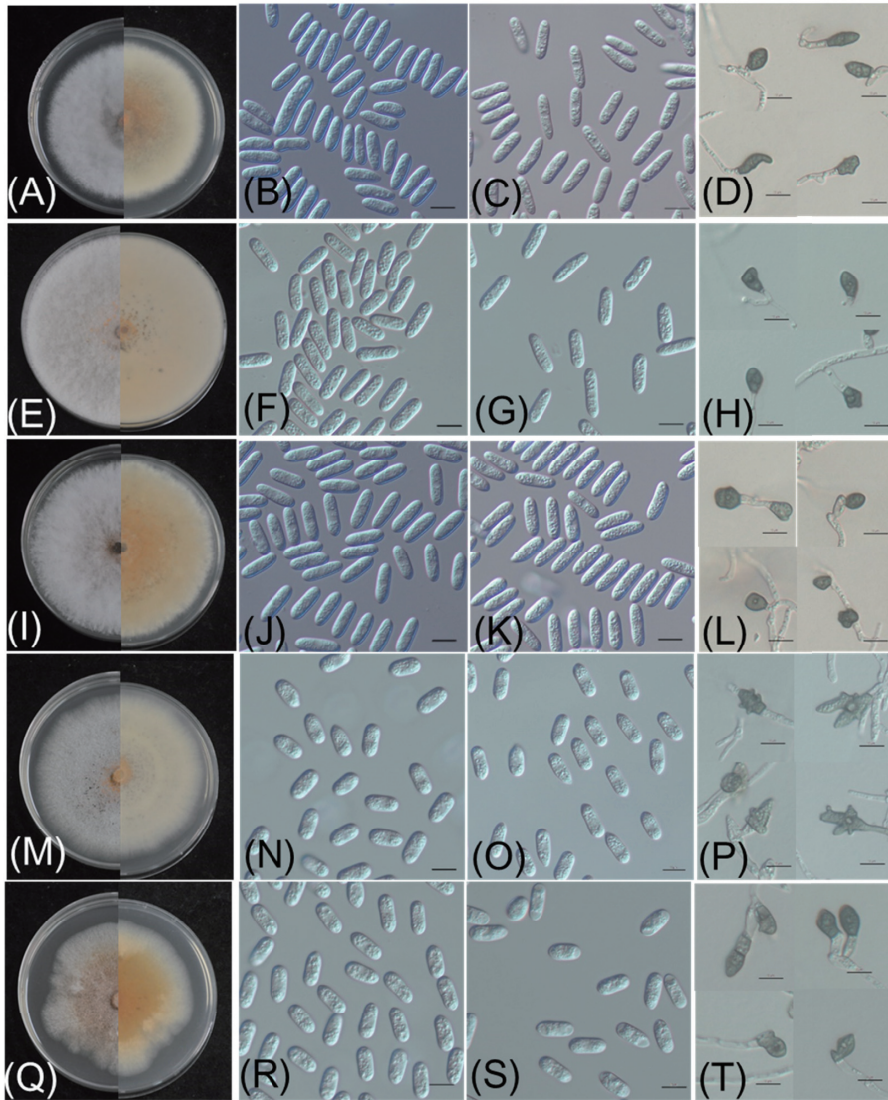


圖 6. 咖啡葉内生炭疽菌之型態。 *Colletotrichum theobromicola* Col-1905 菌株 (A) 在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基 (PDA) 之菌落型態；(B) 在合成低營養瓊脂培養基 (SNA) 上之孢子型態；(C) 在 PDA 上孢子型態及 (D) 附著器型態。 *Colletotrichum tropicale* Col-2165 菌株 (E) 在 PDA 之菌落型態；(F) 在 SNA 上之孢子型態；(G) 在 PDA 上孢子型態及 (H) 附著器型態。 *Colletotrichum* sp. Col-1836 菌株 (I) 在 PDA 之菌落型態；(J) 在 SNA 上之孢子型態；(K) 在 PDA 上孢子型態及 (L) 附著器型態。 *Colletotrichum boninense* Col-2258 菌株 (M) 在 PDA 之菌落型態；(N) 在 SNA 上之孢子型態；(O) 在 PDA 上孢子型態及 (P) 附著器型態。 *Colletotrichum karstii* Col-2247 菌株 (Q) 在 PDA 之菌落型態；(R) 在 SNA 上之孢子型態；(S) 在 PDA 上孢子型態及 (T) 附著器型態。(A)、(E)、(I)、(M) 及 (Q) 左半部為菌落正面照，右半部為菌落背面照。比例尺 = 10 µm。

Fig. 6. Morphology of coffee endophytic *Colletotrichum* species. *Colletotrichum theobromicola* isolate Col-1905 (A) colony on potato dextrose agar (PDA); (B) conidia on synthetic nutrient-poor agar (SNA); (C) conidia on PDA and (D) appressoria. *Colletotrichum tropicale* isolate Col-2165 (E) colony on PDA; (F) conidia on SNA; (G) conidia on PDA and (H) appressoria. *Colletotrichum* sp. isolate Col-1836 (I) colony on PDA; (J) conidia on SNA; (K) conidia on PDA and (L) appressoria. *Colletotrichum boninense* isolate Col-2258 (M) colony on PDA; (N) conidia on SNA; (O) conidia on PDA and (P) appressoria. *Colletotrichum karstii* Col-2247 (Q) colony on PDA; (R) conidia on SNA; (S) conidia on PDA and (T) appressoria. For (A), (E), (I), (M) and (Q), the left side is the upper surface of the colony, and the right side is the reverse. Bar = 10 µm.

cola 之菌落上有放射狀扇形色塊之特徵 (圖 5A)。而 *C. boninense* 複合種之 PDA 菌落, 例如 *C. karstii* Col-2247 菌株, 常在正面有大量明顯橘色產孢 (圖 6Q)。就孢子型態而言, *C. gloeosporioides* 複合種之孢子, 無論在 SNA 或 PDA 培養基上皆產生短桿狀孢子 (圖 5 之孢子型態圖及圖 6B、C、F、G、J、K), 在 SNA 上產生之孢子, 其長寬為 $13.80\text{--}18.09\ \mu\text{m} \times 5.16\text{--}5.81\ \mu\text{m}$ (表 4), 長寬之比例為 2.42–3.28, 而在 PDA 上產生之孢子, 其長寬為 $14.97\text{--}18.12\ \mu\text{m} \times 4.78\text{--}5.50\ \mu\text{m}$, 長寬比例為 2.60–3.44, 其中 *C. gloeosporioides* 菌株 Col-2257 形狀較其他 *C. gloeosporioides* 複合種之菌株短胖 (圖 5N、O)。而 *C. boninense* 複合種之孢子較 *C. gloeosporioides* 複合種明顯短胖 (圖 6N、O、R、S), 在 SNA 上產生之孢子長寬為 $13.64\text{--}14.53\ \mu\text{m} \times 6.68\text{--}6.81\ \mu\text{m}$, 長寬比為 2.04–2.17, 在 PDA 上產生之孢子長寬則為 $14.07\text{--}15.09\ \mu\text{m} \times 6.52\text{--}6.63\ \mu\text{m}$, 長寬比為 2.13–2.33。*C. gloeosporioides* 複合種在 WA 及玻片交界面產生之附著器型態, 大多為橢圓形、近圓形或不整形 (圖 5 之附著器型態及圖 6D、H、L), 其長寬為 $8.80\text{--}11.14\ \mu\text{m} \times 5.44\text{--}6.80\ \mu\text{m}$ 。*C. boninense* 複合種在 WA 及玻片交界面產生之附著器型態則為橢圓形或有多個小突起或裂瓣之不整形 (圖 6P、T), 其長寬為 $8.57\text{--}12.34\ \mu\text{m} \times 6.69\text{--}6.88\ \mu\text{m}$ 。

不同咖啡園咖啡葉內生炭疽菌的種類及比例

為了探討不同咖啡園中各種內生炭疽菌所占之比例, 以 3 地分離得到之菌株進行炭疽菌種類及比例分析, 分別為南投仁愛 48 株分離株、嘉義中埔 30 株分離株及嘉義竹崎 29 株分離株 (圖 7)。其炭疽菌種之決定是由 ApMat 之分群 C1–C12 比對多基因類緣鑑定結果, 確認每一分群對應之炭疽種, 再觀察每一株菌屬於 C1–C12 分支以回推其種類。以結果發現, 3 個咖啡園內生炭疽菌菌相之組成與比例差異頗大。其中南投仁愛咖啡園有 5 種炭疽菌, *C. cordylinicola* 所占比例 83% 為最高, 其次為 *C. tropicale*, 僅有 7%, 其餘還包含 *C. jiangxiense*、*C. siamense* 以及 *C. fructicola*。嘉義中埔

咖啡園以 *C. siamense* 所占比例 43% 為最高, 其次為 *C. cordylinicola* (27%), 另外有 *C. theobromicola* (20%) 及 *C. fructicola* (10%)。嘉義竹崎咖啡園中, *C. fructicola* 及 *C. karstii* 各占了 45% 為最多, 另外還有 *C. jiangxiense* (4%)、*C. boninense* (3%) 以及 *C. gloeosporioides* (3%)。其中 *C. boninense*、*C. gloeosporioides* 及 *C. karstii* 僅在嘉義竹崎咖啡園發現。

討論

本篇報告調查台灣咖啡葉片內生真菌的種類及比例, 並以分離率最高的炭疽菌為主要探討對象, 由分子類緣關係、菌落、孢子大小及附著器形態等特徵分析其種 (species) 之差別, 共發現 10 種咖啡內生炭疽菌, 包括 *C. boninense*、*C. cordylinicola*、*C. fructicola*、*C. gloeosporioides*、*C. jiangxiense*、*C. karstii*、*C. siamense*、*C. theobromicola*、*C. tropicale* 以及 1 個可能為新種的 *Colletotrichum* sp.。比較南投仁愛、嘉義竹崎及嘉義中埔 3 個不同咖啡園中各種炭疽菌所占之比例, 結果發現不同咖啡園間, 內生炭疽菌的組成種類與比例不同, 且彼此之間差異大, 顯示出咖啡內生炭疽菌種類之多樣性。本報告為台灣首探討咖啡內生炭疽菌種類的報告, 其結果可作為後續咖啡病害或內生菌相關研究之參考。

本研究中, 咖啡葉內生炭疽菌種類豐富, 其中包含 1 個可能尚未命名的新種, 此結果顯示炭疽菌作為內生菌, 在咖啡葉片內呈現高度多樣性, 且可能有許多尚未被報導的種類, 具有可發掘及探討的潛力。前人研究中, 分析不同種類植物的內生炭疽菌, 也同樣有此種高度多樣性的現象, 亦發現多個新種。Vieira *et al.* (2014) 研究巴西北部芒果葉之內生炭疽菌, 共發現了 7 個炭疽菌的已知種, 其中包含了 *C. fructicola*、*C. karstii* 以及 *C. tropicale*, 另外還發現 1 個新種 *Colletotrichum endomangiferae*。Ma *et al.* (2018) 研究中國及泰國北部 *Dendrobium* spp. 蘭花的內生炭疽菌, 亦發現 5 種已知種的炭疽菌, 包括了本研究中亦有發現的 *C. fructicola* 及 *C. jiangxiense*, 此外還找到 5 個新種, 總共有 10 種內生炭疽菌。Manamgoda

表 4. 本研究在咖啡葉內生炭疽菌在合成低營養瓊脂培養基與馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基上分生孢子與附著器大小。
Table 4. The size of appressoria and conidia on synthetic nutrient-poor agar (SNA) and potato dextrose agar (PDA) of coffee leaves endophytic *Colletotrichum* spp. in this study.

Species	Isolate	Conidia on SNA ($n = 50$)			Conidia on PDA (μm) ($n = 50$)			Appressorium (μm) ($n = 35$)		
		Length (μm)	Width (μm)	Ratio	Length (μm)	Width (μm)	Ratio	Length (μm)	Width (μm)	Ratio
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> complex										
<i>Colletotrichum cordylinicola</i>	Col-1844	15.84 ± 0.57	5.76 ± 0.24	2.75 ± 0.18	15.00 ± 1.15	5.45 ± 0.34	2.76 ± 0.29	10.96 ± 2.24	5.89 ± 0.96	
	Col-2145	15.06 ± 0.63	5.40 ± 0.26	2.80 ± 0.18	14.97 ± 1.02	5.22 ± 0.24	2.88 ± 0.28	10.69 ± 1.86	6.38 ± 0.83	
<i>Colletotrichum fructicola</i>	Col-1928	15.51 ± 0.90	5.81 ± 0.26	2.68 ± 0.22	15.37 ± 1.08	5.52 ± 0.42	2.81 ± 0.33	9.39 ± 1.48	6.32 ± 0.47	
<i>C. gloeosporioides</i>	Col-2257	13.80 ± 0.72	5.72 ± 0.32	2.42 ± 0.23	14.21 ± 0.96	5.50 ± 0.34	2.60 ± 0.26	8.80 ± 1.23	6.29 ± 0.50	
<i>Colletotrichum jiangxiense</i>	Col-2241	16.54 ± 0.79	5.67 ± 0.30	2.93 ± 0.22	18.12 ± 1.42	5.30 ± 0.32	3.44 ± 0.38	11.14 ± 1.98	6.37 ± 0.77	
<i>Colletotrichum siamense</i>	Col-1834	16.87 ± 0.75	5.59 ± 0.24	3.03 ± 0.22	17.63 ± 1.43	5.32 ± 0.30	3.33 ± 0.36	9.43 ± 1.33	6.31 ± 0.74	
	Col-1924	16.08 ± 0.72	5.43 ± 0.19	2.96 ± 0.18	16.45 ± 0.73	5.11 ± 0.35	3.24 ± 0.29	9.90 ± 1.35	6.80 ± 0.75	
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	Col-1905	15.67 ± 0.86	5.16 ± 0.29	3.05 ± 0.24	16.12 ± 1.06	4.78 ± 0.29	3.39 ± 0.33	10.15 ± 1.63	5.44 ± 0.56	
<i>Colletotrichum tropicale</i>	Col-2165	15.50 ± 0.94	5.45 ± 0.26	2.85 ± 0.26	16.85 ± 1.38	5.26 ± 0.38	3.22 ± 0.37	10.26 ± 2.04	6.18 ± 0.71	
<i>Colletotrichum</i> sp.	Col-1836	16.29 ± 1.63	5.42 ± 0.35	3.02 ± 0.32	16.82 ± 1.16	5.21 ± 0.35	3.25 ± 0.34	8.87 ± 1.73	6.39 ± 1.19	
	Col-1837	18.09 ± 0.93	5.54 ± 0.23	3.28 ± 0.26	17.92 ± 1.12	5.22 ± 0.26	3.44 ± 0.29	9.49 ± 1.24	6.39 ± 0.74	
<i>Colletotrichum boninense</i> complex										
<i>C. boninense</i>	Col-2258	13.64 ± 0.53	6.68 ± 0.25	2.04 ± 0.25	15.09 ± 0.87	6.52 ± 0.32	2.33 ± 0.22	12.34 ± 3.84	6.69 ± 0.73	
<i>Colletotrichum karstii</i>	Col-2247	14.53 ± 0.57	6.70 ± 0.27	2.17 ± 0.12	14.07 ± 1.16	6.63 ± 0.40	2.13 ± 0.26	11.32 ± 2.24	6.75 ± 0.66	
	Col-2260	14.39 ± 0.89	6.81 ± 0.24	2.11 ± 0.16	14.75 ± 0.98	6.62 ± 0.38	2.24 ± 0.25	8.57 ± 1.08	6.88 ± 0.85	

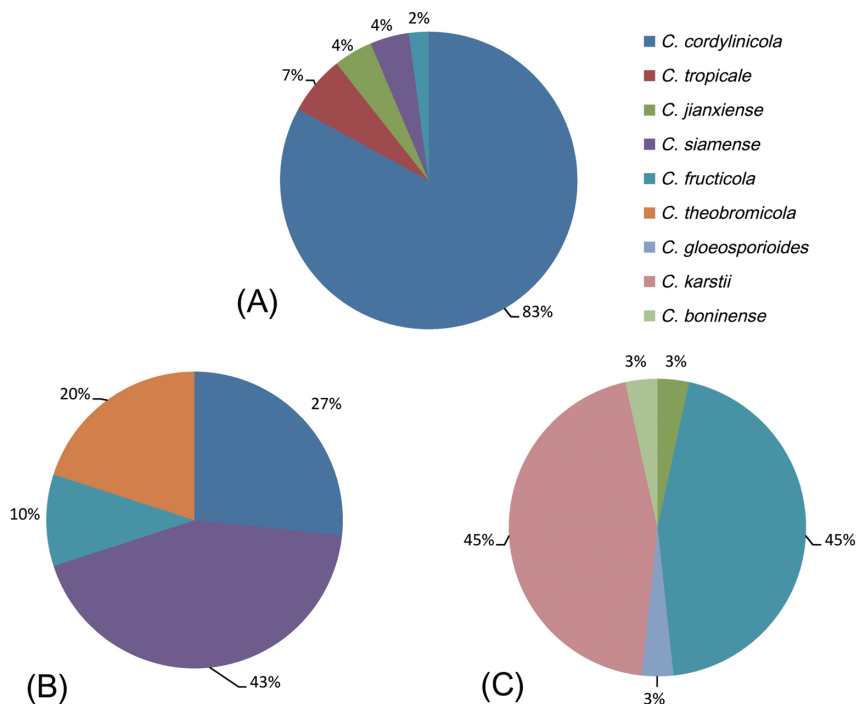


圖 7. (A) 南投仁愛；(B) 嘉義中埔及 (C) 嘉義竹崎 3 個咖啡園所採集之咖啡葉內生炭疽菌種類及分離頻度。

Fig. 7. Species composition and isolation frequency of coffee endophytic *Colletotrichum* species in orchards of (A) Ren-ai Township, Nantou County; (B) Jhongpu Township, Chiayi County; and (C) Zhuqi Township, Chiayi County.

et al. (2013) 則在 2 種熱帶的草類上發現 3 種內生炭疽菌 *C. fructicola*、*C. siamense* 及 *C. tropicale*，另外鑑定 1 個新種 *C. endophytica*。從前述研究，除可看出炭疽菌在植物體內種類的豐富程度外，亦可發現其中有數種炭疽菌，尤其是 *C. fructicola* 及 *C. tropicale*，是植物體內常見的內生炭疽菌種類。

在真菌進行分子鑑定時，常使用 ITS 基因片段進行分析，但其應用於炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.) 之鑑定，較可能產生誤判而無法確實鑑別種間之差異 (Crouch *et al.* 2009; Damm *et al.* 2009)，相較之下，ApMat 及 GAPDH 則可提供較佳的解析度，其中 ApMat 可區分至亞種 (subspecies) (Weir *et al.* 2012; Sharma *et al.* 2013)，然而，僅憑單一序列進行種之鑑定仍有誤判之可能，因此，須利用多基因類緣分析以進一步確認炭疽菌種類。而分析大量菌株時若使用多基因類緣分析，在定序上所需之成本甚高。為此，在大量鑑定炭疽菌之種時，有

些研究者先以 GAPDH 序列將菌株分群，再以分群中部分菌株進行多基因類緣分析，進一步確認該群菌株所屬之種 (Lima *et al.* 2013; Fuentes-Aragón *et al.* 2020)。Sharma *et al.* (2017) 對酪梨炭疽菌的研究中亦顯示，以 ApMat 所建構之類緣樹與 ACT、CAL、ITS、GAPDH、glutamine synthetase 及 TUB 等 6 個基因部分片段串聯後建構之類緣樹有高度相似性。本研究亦曾初步以 ITS 進行分群，結果發現共同分析之已知菌株中，不同種間之菌株常被歸於同一分支，例如 *C. fructicola*、*C. siamense*、*C. tropicale* 及 *C. theobromicola* 多個菌株被歸於同一分支 (clade)，或雖有分支區隔但分支之 bootstrap 值甚低 (< 50%)，無法進行具可信度之分群 (資料未顯示)。故後續以 ApMat 序列為依據，對 *C. gloeosporioides* 複合種下之菌株進行分群，而 *C. boninense* 複合種之菌株則因無 ApMat 序列，改以 GAPDH 進行初步分群。除了 ApMat 及 GAPDH 序列外，CAL 及

TUB 之基因片段含有多個內轉錄間隔區，在演化上易出現較大的分歧，可提供較多資訊，亦有潛力作為炭疽菌在初步分群上所使用之基因片段。

本研究中對各個園區之調查，可發現 7 個咖啡園的 *Colletotrichum* spp.、*Phyllosticta* spp. 以及炭角菌科真菌的比例差異頗大，其中 *Phyllosticta* spp. 及炭角菌科真菌在南投仁愛及嘉義中埔之分離率為 0。另外，在分析嘉義中埔、嘉義竹崎及南投仁愛 3 個咖啡園的內生炭疽菌時，也發現其種類及分離頻度有極大的歧異。究其差異產生的原因，可能與植株所生長之氣候因子，例如溫度、濕度或降雨等相關，也可能與栽培管理方法有關，或受到鄰近作物相影響所致。Oliveira *et al.* (2014) 曾比較慣行和有機咖啡園的內生真菌差異，發現慣行園分離頻度最高的是 *C. gloeosporioides* 複合種，而有機園分離頻度最高的則是 *P. capitalensis*，此外濕季分離到的內生菌數量較多，然而多樣性則是乾季時最高。另一研究調查台灣山區不同海拔高度的森林內生菌，發現內生菌的多樣性受到海拔高度的影響，內生菌菌相的組成，則受寄主、植被種類的影響 (Huang 2020)。本研究中所調查的 3 個園區，嘉義中埔、南投仁愛 2 園區的海拔高度，約為 200 m 及 700 m，而嘉義竹崎的園區位於近阿里山之石桌地區，該處約在海拔 1,300 m 高處，近山區冷涼區域。從調查結果中，嘉義中埔及南投仁愛的內生炭疽菌之菌相也較接近，皆有 *C. cordylinicola*、*C. fructicola* 及 *C. siamense*，且 *C. cordylinicola* 所占比例較高，推測此種菌相上的差異，或許可能跟 3 地的海拔高度及溫度、濕度等天氣因子相關，然而仍需有更多咖啡園之分析結果，以確認其相關性。

本篇報告所報導之 9 個已知種的內生炭疽菌，除了 *C. jianxiense* 及 *C. cordylinicola* 外，其餘 7 個已知種皆有造成咖啡病害的紀錄。例如越南的咖啡炭疽病原菌有 *C. boninense* 及 *C. gloeosporioides* (Nguyen *et al.* 2010)，可在咖啡果實上造成壞疽斑；泰國則有 *C. siamense* 及 *C. fructicola* 為咖啡果實炭疽病病原菌 (Prihasutti *et al.* 2009)；墨西哥的報導指出 *C. karstii*、*C. siamense* 及 *C. theobromicola* 可造成咖啡葉

片壞疽 (Cristóbal-Martínez *et al.* 2017)。波多黎各則報導 *C. fructicola*、*C. siamense*、*C. theobromicola* 及 *C. tropicale* 可造成咖啡果實腐爛，且孢子可能經由咖啡果小蠹進行傳播。本研究中之咖啡葉內生菌，雖與造成病害之病原菌為同種，但未在咖啡葉上造成病徵，作為內生菌，此類炭疽菌存在之可能性有 3 種，其一是病原性極弱之機會性病菌，平時潛伏於寄主體內，待寄主生理狀況衰弱時轉為病原菌進行侵染，其二可能是對寄主幾乎沒有任何影響的片利共生，其三則是對寄主有益，可能為具有拮抗菌的潛力，或有幫助寄主抵抗逆境之能力。此外，*C. cordylinicola* 與 *C. jianxiense* 尚無在咖啡上造成病害之報導，但已知 *C. cordylinicola* 會造成朱蕉 (Sharma *et al.* 2014) 及蓮霧 (Phouli-vong *et al.* 2011) 的炭疽病，*C. jianxiense* 可造成茶花 (Liu *et al.* 2015) 及酪梨 (Fuentes-Aragón *et al.* 2020) 之炭疽病。由於咖啡炭疽菌為普遍存在咖啡植株之內生菌，未來在探究咖啡葉片相關病害時，應審慎進行病原性測定並排除此些內生真菌之干擾。

植物內生菌可能具有拮抗病原菌的能力，或者具有幫助植物抵抗逆境或促進生長等功能。在咖啡內生菌拮抗病原菌的研究上，Bongiorno *et al.* (2016) 亦從咖啡葉片中分離出高比例的內生炭疽菌，且從菌絲抑制試驗中，發現有些內生性的炭疽菌可抑制病原性的炭疽菌。Monteiro *et al.* (2017) 則是篩選具揮發性有機物質 (volatile organic compounds; VOCs) 的咖啡內生菌，結果發現 *Muscodor coffeanum*、*Muscodor vitigenus*、*Muscodor yucatanensis* 及 *Simplicillium* sp. 產生之 VOCs 可抑制多種病原菌，例如抑制 *Botrytis cinerea*、*Fusarium solani*、*Fusarium verticillioides* 及 *C. coffeicola* 之菌絲生長，其中 *M. coffeanum* 的 VOCs 更可抑制 *C. coffeicola* 侵染咖啡果實。另一研究篩選可抗咖啡銹病菌 *H. vastatrix* 之內生菌，結果顯示數株內生細菌 *Brevibacillus choshinensis*、*Salmonella enterica*、*Bacillus megaterium*、*Microbacterium testaceum*、*Cedecea davisae* 噴施在幼苗上可以有效降低咖啡銹病的嚴重度，且部分菌株具有促進咖啡生長的功能。

能 (Silva *et al.* 2012b)。種種研究顯示，許多咖啡內生菌確實有成為病害拮抗菌的潛力。另外，*Colletotrichum* spp. 除了具有拮抗菌的潛力外，也可能促進植物生長。阿拉伯芥根部內生菌的研究中，發現炭疽菌 *Colletotrichum tofieldiae* 可協助植物根部吸收磷元素，以促進其生長 (Hiruma *et al.* 2016)。

本研究調查了 7 個咖啡園區之內生菌，瞭解台灣咖啡園主要的內生菌種類，並發現咖啡葉片內生炭疽菌之多樣性。研究中，發現內生炭疽菌種類豐富，未來進行之研究，可持續對不同咖啡園之內生炭疽菌進行調查，以瞭解是否有更多不同種類，或其多樣性是否與栽培條件相關，而對於已分離保存之菌株，則可進一步確認其是否對咖啡具潛在之病原性，或進行咖啡葉片相關病害之病原菌拮抗試驗，探討這些內生菌未來是否具有咖啡病害生物防治應用之潛力。

誌謝

本研究承行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所張淑芬副研究員、王泰權助理研究員、陳柏宏助理研究員協助樣本收集，助理蔡佳達先生協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

- Arnold, A. E., L. C. Mejia, D. Kylo, E. I. Rojas, Z. Maynard, N. Robbins, and E. A. Herre. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS* 100:15649–15654. doi:10.1073/pnas.2533483100
- Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th ed. APS Press. St. Paul, MN. 218 pp.
- Bongiorno, V. A., S. A. Rhoden, A. Garcia, J. C. Polonio, J. L. Azevedo, J. O. Pereira, and J. A. Pamphile. 2016. Genetic diversity of endophytic fungi from *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 in organic crops. *Ann. Microbiol.* 66:855–865. doi:10.1007/s13213-015-1168-0
- Cannon, P. F., U. Damm, P. R. Johnston, and B. S. Weir. 2012. *Colletotrichum*: Current status and future directions. *Stud. Mycol.* 73:181–213. doi:10.3114/sim0014
- Carbone, I. and L. M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553–556. doi:10.1080/00275514.1999.12061051
- Chang, S. F., H. R. Yang, J. C. Liu, and M. Y. Lin. 2011. *Culture Management of Coffee*. Taiwan Agricultural Research Institute. Taichung, Taiwan. 37 pp. (in Chinese)
- Cristóbal-Martínez, A. L., M. Yáñez-Morales, R. Solano-Vidal, O. Segura-León, and A. Hernández-Anguiano. 2017. Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico. *Eur. J. Plant Pathol.* 147:605–614. doi:10.1007/s10658-016-1029-0
- Crouch, J. A., B. B. Clarke, and B. I. Hillman. 2009. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored gramicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia* 101:648–656. doi:10.3852/08-231
- Damm, U., J. H. C. Woudenberg, P. F. Cannon, and P. W. Crous. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Divers.* 39:45–87.
- Damm, U., P. F. Cannon, J. H. C. Woudenberg, and P. W. Crous. 2012a. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Stud. Mycol.* 73:37–113. doi:10.3114/sim0010
- Damm, U., P. F. Cannon, J. H. C. Woudenberg, P. R. Johnston, B. S. Weir, Y. P. Tan, R. G. Shivas, and P. W. Crous. 2012b. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Stud. Mycol.* 73:1–36. doi:10.3114/sim0002
- Debbab, A., A. H. Aly, and P. Proksch. 2011. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. *Fungal Divers.* 49:1–12. doi:10.1007/s13225-011-0114-0
- De Silva, D. D., J. Z. Groenewald, P. W. Crous, P. K. Ades, A. Nasruddin, O. Mongkolporn, and P. W. J. Taylor. 2019. Identification, prevalence and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose of *Capsicum annuum* in Asia. *IMA Fungus* 10:8. doi:10.1186/s43008-019-0001-y
- Fuentes-Aragón, D., H. V. Silva-Rojas, V. Guarnaccia, J. A. Mora-Aguilera, S. Aranda-Ocampo, N. Bautista-Martínez, and D. Téliz-Ortiz. 2020. *Colletotrichum* species causing anthracnose on avocado fruit in Mexico: Current status. *Pl. Pathol.* 69:1513–1528. doi:10.1111/ppa.13234
- 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.

- doi:10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995
- Hiruma, K., N. Gerlach, S. Sacristán, R. T. Nakano, S. Hacquard, B. Kracher, U. Neumann, D. Ramirez, M. Bucher, R. J. O'Connell, and P. Schulze-Lefert. 2016. Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. *Cell* 165:464–474. doi:10.1016/j.cell.2016.02.028
- Huang, Y. L. 2020. Effect of host, environment and fungal growth on fungal leaf endophyte communities in Taiwan. *J. Fungi* 6:244. doi:10.3390/jof6040244
- Jayawardena, R. S., C. S. Bhunjun, K. D. Hyde, E. Gentekaki, and P. Itthayakorn. 2021. *Colletotrichum*: Lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species. *Mycosphere* 12:519–669. doi:10.5943/mycosphere/12/1/7
- 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
- Lima, N. B., M. V. de A. Batista, M. A. de Moraes, M. A. G. Barbosa, S. J. Michereff, K. D. Hyde, and M. P. S. Câmara. 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Divers.* 61:75–88. doi:10.1007/s13225-013-0237-6
- Liu, F., B. S. Weir, U. Damm, P. W. Crous, Y. Wang, B. Liu, M. Wang, M. Zhang, and L. Cai. 2015. Unraveling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: Employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. *Persoonia* 35:63–86. doi:10.3767/003158515X687597
- Ma, X., S. Nontachaiyapoom, R. S. Jayawardena, K. D. Hyde, E. Gentekaki, S. Zhou, Y. Qian, T. Wen, and J. Kang. 2018. Endophytic *Colletotrichum* species from *Dendrobium* spp. in China and Northern Thailand. *MycKeys* 43:23–57. doi:10.3897/mycokeys.43.25081
- Manamgoda, D. S., D. Udayanga, L. Cai, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2013. Endophytic *Colletotrichum* from tropical grasses with a new species *C. endophytica*. *Fungal Divers.* 61:107–115. doi:10.1007/s13225-013-0256-3
- Monteiro, M. C. P., N. M. Alves, M. V. de Queiroz, D. B. Pinho, O. L. Pereira, S. M. C. de Souza, and P. G. Cardoso. 2017. Antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *Biosci. J.* 33:381–389. doi:10.14393/BJ-v33n2-34494
- Nguyen, P. T. H., O. V. Pettersson, P. Olsson, and E. Liljeroth. 2010. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam. *Eur. J. Plant Pathol.* 127:73–87. doi:10.1007/s10658-009-9573-5
- 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.
- Oliveira, R. J. V., R. G. Souza, T. E. F. Lima, and M. A. Q. Cavalcanti. 2014. Endophytic fungal diversity in coffee leaves (*Coffea arabica*) cultivated using organic and conventional crop management systems. *Mycosphere* 5:523–530. doi:10.5943/mycosphere/5/4/4
- Phoulivong, S., L. Cai, N. Parinn, H. Chen, K. A. Abd-Elsalam, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2011. A new species of *Colletotrichum* from *Cordyline fruticosa* and *Eugenia javanica* causing anthracnose disease. *Mycotaxon* 114:247–257. doi:10.5248/114.247
- Prihastuti, H., L. Cai, H. Chen, E. H. C. McKenzie, and K. D. Hyde. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Divers.* 39:89–109.
- Ramakuwela, T., J. Hatting, C. Bock, F. E. Vega, L. Wells, G. N. Mbata, and D. Shapiro-Ilan. 2020. Establishment of *Beauveria bassiana* as a fungal endophyte in pecan (*Carya illinoensis*) seedlings and its virulence against pecan insect pests. *Biol. Control* 140:104102. doi:10.1016/j.biocontrol.2019.104102
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes v. 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61:539–542. doi:10.1093/sysbio/sys029
- Saikkonen, K., S. Saari, and M. Helander. 2010. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Divers.* 41:101–113. doi:10.1007/s13225-010-0023-7
- Santamaría, J. and P. Bayman. 2005. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microb. Ecol.* 50:1–8. doi:10.1007/s00248-004-0002-1
- Sharma, G., N. Kumar, B. S. Weir, K. D. Hyde, and B. D. Shenoy. 2013. The ApMat marker can resolve *Colletotrichum* species: A case study with *Mangifera indica*. *Fungal Divers.* 61:117–138. doi:10.1007/s13225-013-0247-4
- Sharma, G., M. Maymon, and S. Freeman. 2017. Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Sci. Rep.*

- 7:15839. doi:10.1038/s41598-017-15946-w
- Sharma, K., E. Goss, and A. H. C. van Bruggen. 2014. Isolation and identification of the fungus *Colletotrichum cordylinicola* causing anthracnose disease on *Cordyline fruticosa* in Florida. *HortScience* 49:911–916. doi:10.21273/HORTSCI.49.7.911
- Silva, D. N., P. Talhinhos, V. Várzea, L. Cai, O. Paulo, and D. Batista. 2012a. Application of the *Apn2/MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: An example from coffee (*Coffea* spp.) hosts. *Mycologia* 104:396–409. doi:10.3852/11-145
- Silva, H. S. A., J. P. L. Tozzi, C. R. F. Terrasan, and W. Bettiol. 2012b. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. *Biol. Control* 63:62–67. doi:10.1016/j.biocontrol.2012.06.005
- Suryanarayanan, T. S. 2013. Endophyte research: Going beyond isolation and metabolite documentation. *Fungal Ecol.* 6:561–568. doi:10.1016/j.funeco.2013.09.007
- Suryanarayanan, T. S., N. Thirunavukkarasu, M. B. Govindarajulu, and V. Gopalan. 2012. Fungal endophytes: An untapped source of biocatalysts. *Fungal Divers.* 54:19–30. doi:10.1007/s13225-012-0168-7
- Templeton, M. D., E. H. A. Rikkerink, S. L. Solon, and R. N. Crowhurst. 1992. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* 122:225–230. doi:10.1016/0378-1119(92)90055-T
- Tzean, S. S., K. C. Tzean, C. A. Chang, T. T. Tsai, and H. F. Yen. 2019. List of Plant Diseases in Taiwan. 5th ed. Taiwan Phytopathological Society. Taichung, Taiwan. 329 pp. (in Chinese)
- Vaidya, G., D. J. Lohman, and R. Meier. 2011. SequenceMatrix: Concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27:171–180. doi:10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x
- Varma, P. K., S. Uppala, K. Pavuluri, K. J. Chandra, M. M. Chapala, and K. V. K. Kumar. 2017. Endophytes: Role and functions in crop health. p.291–310. *in: Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives Vol.1: Fundamental Mechanisms, Methods and Functions.* (Singh, D. P., H. B. Singh, and R. Prabha, eds.) Springer. Singapore. 657 pp. doi:10.1007/978-981-10-5813-4_15
- Vega, F. E., A. Simpkins, M. C. Aime, F. Posada, S. W. Peterson, S. A. Rehner, F. Infante, A. Castillo, and A. E. Arnold. 2010. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecol.* 3:122–138. doi:10.1016/j.funeco.2009.07.002
- Vieira, W. A. S., S. J. Michereff, M. A. de Moraes Jr., K. D. Hyde, and M. P. S. Câmara. 2014. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Divers.* 67:181–202. doi:10.1007/s13225-014-0293-6
- Wang, H., M. Qi, and A. J. Culter. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucl. Acids Res.* 21:4153–4154. doi:10.1093/nar/21.17.4153
- Wang, Y. C., X. Y. Hao, L. Wang, B. Xiao, X. C. Wang, and Y. J. Yang. 2016. Diverse *Colletotrichum* species cause anthracnose of tea plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] in China. *Sci. Rep.* 6:35287. doi:10.1038/srep35287
- Weir, B. S., P. R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Stud. Mycol.* 73:115–180. doi:10.3114/sim0011
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315–322. *in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* (Innis, M. A., J. J. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds.) Academic Press, San Diego, CA. 482 pp.

Study of Endophytic *Colletotrichum* spp. in Coffee Leaves in Taiwan

Chao-Jung Wu¹, Sui-Li Hsu², Su-Yu Lai², Miao-Chun Lin², and Hui-Fang Ni^{3,*}

Abstract

Wu, C. J., S. L. Hsu, S. Y. Lai, M. C. Lin, and H. F. Ni. 2022. Study of endophytic *Colletotrichum* spp. in coffee leaves in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 71(3):243–266.

In this study, healthy coffee leaves from seven coffee orchards were collected. The seven orchards were located in different areas, namely Ren-ai Township, Nantou County, Gukeng Township, Yunlin County, Chiayi Agricultural Experiment Station, Jhongpu, and Zhuqi Township, Chiayi County, Dongshan District, Tainan City, and Taiwu Township, Pingtung County. Coffee leaves were surface-disinfected and incubated on acidified potato dextrose agar to obtain endophytic fungi. *Colletotrichum* spp., *Phyllosticta* spp. and Xylariaceae fungi were isolated from these seven orchards with a high frequency, and *Colletotrichum* spp. were the most frequently isolated fungi in six of the seven orchards. According to the results of phylogenetic analysis based on actin, calmodulin, chitin synthase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, β -tubulin sequences constructed by Bayesian inference, the endophytic *Colletotrichum* spp. in coffee leaves contained nine species belonging to *Colletotrichum gloeosporioides* species complex, namely *Colletotrichum cordylinicola*, *Colletotrichum fruticola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum jiangxiense*, *Colletotrichum siamense*, *Colletotrichum theobromicola*, *Colletotrichum tropicale* and an unknown new *Colletotrichum* sp., and two *Colletotrichum boninense* complex species, *C. boninense* and *Colletotrichum karstii*. Isolation frequency and species composition of endophytic *Colletotrichum* spp. from three orchards were compared. The *Colletotrichum* spp. composition of the orchard located in Ren-ai Township, Nantou County resembled that located in Jhongpu Township, Chiayi County. The isolation frequencies of *C. cordylinicola* were 83% and 27% in orchards of Ren-ai and Jhongpu, respectively. *C. siamense* was also isolated from both of the two orchards. In contrast, no *C. cordylinicola* or *C. siamense* was isolated from the orchard in Zhuqi Township, Chiayi County. The most frequently isolated *Colletotrichum* spp. in Zhuqi orchard were *C. fruticola* (45%) and *C. karstii* (45%). The result suggested that endophytic *Colletotrichum* spp. in coffee leaves are highly diverse, and the fungal composition is different among orchards. This is the first intensive study of endophytic *Colletotrichum* spp. in coffee leaves using multi-locus sequence analysis to resolve the species, and the result provides information for further study on coffee pathogen or endophyte.

Key words: Coffee, Endophyte, *Colletotrichum* spp.

Received: October 4, 2021; Accepted: March 18, 2022.

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

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

² Project Assistants, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

³ Associate Research Fellow and Division Director, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.