

台灣本土白殭菌於咖啡果小蠹之田間自然感染率及菌株篩選

陳柏宏¹ 梁鈺平¹ 倪蕙芳^{2*}

摘要

陳柏宏、梁鈺平、倪蕙芳。2023。台灣本土白殭菌於咖啡果小蠹之田間自然感染率及菌株篩選。台灣農業研究 72(3):219–236。

白殭菌 (*Beauveria bassiana*) 為目前國外防治咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei*) 重要微生物資材，由於我國現行尚無白殭菌商品可供咖啡產業應用，故本研究目的一方面調查此菌於本土咖啡園自然感染率，另一方面收集本土白殭菌菌株，透過分離、鑑定及室內生物檢定，篩選出具防治咖啡果小蠹潛力菌株供製劑開發。研究結果顯示，白殭菌於不同咖啡園自然發生率差異頗大，於雲林縣古坑鄉試區 (粗放栽培)，蟲蛀果內咖啡果小蠹雌蟲感染白殭菌比例最高達 13.3% (平均 3.1%)，以 3–6 月為白殭菌盛行期，該期間平均 70.0% 雌蟲死亡個體皆感染白殭菌。於南投縣仁愛鄉試區 (慣行栽培)，白殭菌感染率極低，最高僅 4.9% (平均 0.6%)。潛力菌株篩選上，已自台中市、南投縣及雲林縣等不同產區採集 98 株分離株，並挑選 7 株菌株作為候選菌株，經室內培養形態與 ITS、Bloc 及 EF1 序列分析鑑定後，確認皆屬 *B. bassiana*。各菌株於不同環境溫度下菌絲生長、孢子發芽及對咖啡果小蠹致死能力均存在差異，以分離株 B005、B025 及 B068 較具耐高溫特性，於 32°C 下孢子發芽率分別達 98%、94% 及 88%，其他菌株發芽率則介於 30–60%。多數菌株於 25°C 下致死能力較佳，接種後第 7 日前即可達 100% 致死率。於 32°C 高溫環境下各菌株致死能力明顯下降，於接種後第 8 日前皆無法達 100% 致死率，但仍以分離株 B005、B039 及 B068 表現較佳，第 8 日致死率分別為 67%、72% 及 77%。後續研究將持續菌株篩選，並先行以分離株 B068 等耐高溫菌株進行製劑，希冀未來能開發適合台灣防治咖啡果小蠹的本土白殭菌產品，裨益我國咖啡產業發展。

關鍵詞：咖啡果小蠹、白殭菌、生物防治。

前言

咖啡為世界性重要飲料作物，屬於茜草科 (Rubiaceae) 咖啡屬 (*Coffea*) 植物。咖啡屬物種計有 120 餘種，多為常綠灌木，其中僅阿拉比卡咖啡 (*C. arabica* L., arabica coffee) 與羅布斯塔咖啡 (*C. canephora* Pierre ex A. Froehner, robusta coffee) 主要用於經濟生產並作為飲品 (Davis *et al.* 2006; Guyot *et al.* 2020)。此 2 種咖啡原生於非洲，適合生長於溫暖潮濕的常綠闊葉林 (Davis *et al.* 2006)，故產區多位於南、北回歸線間之熱帶與亞熱帶地區，目前在非洲、亞洲及美洲等全球 80 多個國家的總裁培面積逾

1,000 萬公頃，約為茶葉生產面積之 2 倍 (Food and Agriculture Organization of the United Nations n.d.)。咖啡於台灣種植歷史亦有百年以上，根據農糧署統計資料 (https://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp)，國產咖啡於 2021 年在台灣之種植面積 1,169 ha，收穫面積 1,142 ha，年收穫量約 900 Mg，年產值近 7 億新台幣，全台栽培面積達 100 ha 以上的主要產區包含屏東縣 (232 ha)、南投縣 (190 ha)、台東縣 (155 ha) 及嘉義縣 (135 ha)。近十多年來台灣咖啡種植量劇增，栽培面積相較於 2011 年 (763 ha) 成長 53%，顯見國內咖啡產業之蓬勃發展。

投稿日期：2023 年 2 月 18 日；接受日期：2023 年 4 月 7 日。

* 通訊作者：hfni@tari.gov.tw

¹ 農業部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 農業部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。

台灣咖啡生產面臨的病蟲害以咖啡果小蠹 (*Hypothenemus hampei* (Ferrari)) (Coleoptera: Curculionidae) 為最具破壞性之害蟲種類 (Vega *et al.* 2009; Johnson *et al.* 2020)。咖啡果小蠹寄主範圍以咖啡屬植物為主，特別以羅布斯塔咖啡與阿拉比卡咖啡為其在野外或田間之重要寄主 (Vega *et al.* 2012; Vega *et al.* 2019; Vega *et al.* 2020)。此種甲蟲體型細小，雌成蟲體長僅 1.6–1.9 mm，雄成蟲體型又略小於雌蟲 (0.99–1.3 mm) 且後翅退化 (Vega *et al.* 2015a; Vega *et al.* 2015b)。咖啡果小蠹大半生活史於咖啡果實內度過，雌蟲交尾後會伺機找尋其它咖啡果實以產下子代，未熟青果與紅熟果皆是其危害對象 (Damon 2000; Vega *et al.* 2015a; Dufour *et al.* 2021)。雌蟲偏好等待果實乾物重較高時 (開花後 120–150 d)，方於胚乳內鑽蛀隧道並產卵，而幼蟲孵化後隨即蠶蛀胚乳為食 (Baker *et al.* 1992; Ruiz-Cárdenas & Baker 2010)。此般危害直接影響咖啡產量與品質，亦會導致落果，甚至增加果實受微生物污染之風險 (Damon 2000; Rezende & Taniwaki 2020)。咖啡果小蠹原產於非洲 (Vega *et al.* 2019)，因全球咖啡產業愈趨興盛，該蟲亦隨之擴散各地，目前多數咖啡產區皆遭其入侵，近年來於夏威夷 (2010 年)、巴布亞新紐內亞 (2017 年) 及中國 (2020 年) 等地亦仍持續有新入侵紀錄傳出 (Johnson *et al.* 2020; Sun *et al.* 2020)，台灣則首次於 2007 年發現其蹤跡 (Lin *et al.* 2010)。咖啡果小蠹的出現對各國咖啡產業著實為一大打擊，例如於此蟲入侵夏威夷之初期 (2011–2013 年)，即造成當地每年 1,010–1,560 萬美元經濟損失；在巴西，每年因此蟲害所致的損失更高達 2,150–3,580 萬美元 (Oliveira *et al.* 2012; Leung *et al.* 2014; Johnson *et al.* 2020)。

受限於咖啡果小蠹藏匿於咖啡果實內的生態習性 (Damon 2000; Vega *et al.* 2015a)，若僅仰賴施用化學殺蟲劑則防治效果不盡理想，亦非長久之計 (Villalba-Gault *et al.* 1995; Johnson *et al.* 2020)，因此夏威夷與哥倫比亞等國已開始導入整合性害物管理 (integrated pest management; IPM) 於咖啡生產，結合蟲害監測、化學殺蟲劑、生物性資材施用及耕作防治

等技術，有效降低蟲害發生 (Aristizábal *et al.* 2012; Aristizábal *et al.* 2016; Johnson *et al.* 2020)。各項防治技術中，除落實田間衛生 (sanitation) 極其重要外 (Aristizábal *et al.* 2011; Aristizábal *et al.* 2017; Cure *et al.* 2020; Kawabata *et al.* 2020)，生物防治更是相當關鍵的一環，並被視為替代化學防治之有效策略 (Benavides *et al.* 2012)。目前已知數種捕食或寄生咖啡果小蠹之昆蟲、線蟲及真菌等天敵 (Damon 2000; Vega *et al.* 2015a; Escobar-Ramírez *et al.* 2019)，其中又以巴氏蠶白殭菌 (*Beauveria bassiana*) (Bals.-Criv.) Vuill.) (簡稱白殭菌) 最常被運用於防治咖啡果小蠹，亦具有不少商品化製劑 (de Faria & Wraight 2007; Aristizábal *et al.* 2016; Mascarín & Jaronski 2016; Aristizábal *et al.* 2017; Mariño *et al.* 2017)。

白殭菌為蟲生真菌 (entomopathogenic fungi)，屬於子囊菌門 (Ascomycota)，肉座菌目 (Hypocreales) 之蟲草科 (Cordycipitaceae)，已知寄主範圍包括 700 種以上昆蟲綱 (Insecta) 與蜱蟎亞綱 (Acari) 等節肢動物 (Zimmermann 2007)。此真菌普遍存在受咖啡果小蠹危害的咖啡果園，在不同國家、田區、季節及環境之白殭菌，對咖啡果小蠹自然感染程度差距甚大 (Monzón *et al.* 2008; Vega *et al.* 2009; Wraight *et al.* 2018)，Góngora *et al.* (2009) 指出在哥倫比亞田間的白殭菌自然發生率約為 10%；與多數真菌相同，高濕環境有助白殭菌侵染蟲體 (Pell *et al.* 2010; Vera *et al.* 2011)，故在遮陰樹下施用白殭菌有利於防治咖啡果小蠹 (Aristizábal *et al.* 2016)；若將白殭菌孢子懸浮液施灑於地面上咖啡落果，亦能造成咖啡樹上 30–50% 咖啡果小蠹感染白殭菌，並降低 50% 以上咖啡果小蠹侵染率 (Bustillo *et al.* 1999; Vera *et al.* 2011)；同時，施用時機亦是白殭菌防治成功與否的關鍵，若田間咖啡果小蠹已嚴重發生 (侵染率逾 12.6%) 且無搭配清園，則即使連續每月施用白殭菌並無法有效控制此蟲害之發生 (Woodill *et al.* 2017)。Hollingsworth *et al.* (2020) 建議白殭菌施用時機應視咖啡果小蠹防治基準而定，如此施藥方符合經濟效益且達防治效果。

隨著國內咖啡產業持續發展，咖啡果小蠹危害狀況亦日趨嚴重，各產區多遭其肆虐。台灣現行尚無登記防治此害蟲之化學殺蟲劑或微生物農藥等資材，目前雖有推廣懸掛咖啡果小蠹誘蟲器，但礙於陷阱誘捕蟲數有限，大規模吊掛又需耗費較高成本與人力，故目前主要以落實田間衛生為減少蟲害之防治方法。借鏡夏威夷與哥倫比亞等國經驗，白殭菌為有效且環境友善之防治資材，故本團隊著手於本土白殭菌防治咖啡果小蠹之相關研究，試圖解決當前蟲害管理上的困境，以提升國產咖啡品質。本研究除調查本土白殭菌於咖啡園的自然感染率，同時採集與鑑定各地白殭菌菌株，並進一步評估不同溫度下各分離株之菌絲生長、孢子發芽及對咖啡果小蠹室內病原性的差異，以篩選具潛力分離株作為後續生物製劑開發與白殭菌田間施用方法之基礎。

材料與方法

咖啡果小蠹田間自然感染白殭菌之調查

本研究自 2021 年 3 月至同年 12 月，進行田間白殭菌於咖啡果小蠹自然發生率調查。調查咖啡園樣區位於南投縣仁愛鄉（海拔約 675 m）與雲林縣古坑鄉（海拔約 400 m），園內栽培品種均為阿拉比卡咖啡（*C. arabica*）。兩處果園皆有咖啡果小蠹發生，仁愛試區為慣行防治區，於 2021 年 2 至 7 月共計施用 7 次化學農劑，古坑試區則無施用化學農藥。白殭菌調查之取樣方式參考 Bustillo *et al.* (1998) 所建立之 30 棵樹取樣法 (30-tree sampling method)，自果園隨機選定 30 棵咖啡樹，每株隨機取樣 3 顆遭受咖啡果小蠹危害未熟果 (green berry)，果實經解剖後以鏡檢方式觀察果實內部雌蟲存活或死亡狀況（子代不計），疑似感染白殭菌死亡個體則依照本文下列方法進行病原分離，待確認菌種後予以紀錄。本調查每 2 wk 進行 1 次。調查數據轉換為咖啡果小蠹死亡率（死亡蟲數/總蟲數）與白殭菌感染率（感染白殭菌蟲數/總蟲數）。

白殭菌之分離與保存

本研究自台南市東山區、雲林縣古坑鄉、

南投縣仁愛鄉、嘉義縣竹崎鄉及台中市東勢區咖啡園內，自蟲蛀果之疑似感染白殭菌蟲體進行真菌分離。分離方式係將染菌蟲體以雙面膠黏貼於培養基之培養皿上蓋內側，蟲體上所生成之分生孢子自然落於含有 300 mg L⁻¹ 鏈黴素 (streptomycin) 與 50 mg L⁻¹ 四環黴素 (tetracycline) 之 PDA (potato dextrose agar) 培養基 (Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) 上。待孢子長出菌絲後，切取菌絲尖端並培養於另一 PDA 培養基，於 25°C 培養 14 d，再於產孢後進行單孢分離，所得菌株經編號並切取菌絲塊保存於無菌水，另將分生孢子保存於 26.4% 甘油溶液並保存於 -20°C 冰箱。

本研究所收集之菌株，依據分離株採集地點與菌落培養形態差異，挑選 7 株由咖啡果小蠹分離之白殭菌分離株，菌株編號分別為 B005 (台南東原區分離株)、B015 (雲林古坑鄉分離株)、B025 (南投仁愛鄉分離)、B039 (嘉義竹崎鄉分離)、B045 (雲林古坑鄉分離株)、B068 (台中東勢區分離株) 及 B070 (台中東勢區分離株)，另使用保存於農業部農業試驗所嘉義農業試驗分所植物病害管理研究室由甘藷蟻象分離之白殭菌 B001 菌株，以及由荔枝椿象所分離之白殭菌 B098 與 B102 菌株，作為不同寄主來源共同比較之菌株，以上共 10 株白殭菌菌株一併進行以下各項試驗。

白殭菌之形態與分子鑑定

白殭菌分離株培養於含 1% 酵母抽出物 (yeast extract; Gibco™, Billings, MT, USA) 之 SDYA (Sabouraud dextrose agar with yeast extract; SDAY, NeoGen, Lansing, MI, USA)，於 25°C 定溫箱中黑暗培養 14 d，觀察並拍攝菌落形態。為能清楚觀察白殭菌產孢結構，另於 2% WA (water agar) 培養基上置入 1 片 22 mm × 22 mm 大小已消毒過之蓋玻片，蓋玻片上再放上 PDA 培養基塊 (約 5 mm × 5 mm)，將測試菌株之孢子懸浮液 10 μL 接種於此 PDA 培養基塊後，於上方再覆蓋上 1 無菌蓋玻片 (22 mm × 22 mm)，置於 25°C 培養 5 d 後，將上方蓋玻片取下，置於含 10 μL 0.02 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, Singapore) 水溶液之載玻片上，以干涉位像差 (differential interference contrast;

DIC) 顯微鏡 (Nikon Ni, Nikon, Tokyo, Japan) 進行觀察，並以 Gryphax 軟體 (Gryphax Naos, Jenoptik, Jena, Germany) 拍攝產孢構造及量測 50 個以上之分生孢子大小。

為進一步以核酸分析確認本研究所分離之白殭菌種類，將測試菌株培養於 PDA 培養基，待長出足量菌絲後，刮取少量菌絲，置於 50 μ L Magic quick seed extract solution (Bio-Genesis, Taipei, Taiwan)，以 65°C/6 min 與 95°C/2 min 處理後，作為 PCR (polymerase chain reaction) 之 DNA 模板。本試驗所使用之 PCR 溶液包含 5 \times PCR 緩衝液 (Fast-Run Taq Master Mix) (Protech Technology Enterprise, Taipei, Taiwan) 與 0.5 μ M primer，並以無菌水將總體積調整至 25 μ L。所使用引子對共 3 組，分別為增幅 ITS (internal transcribed spacer) 序列之 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 與 ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.* 1990)，增幅 Bloc (B locus intergenic region) 序列之 B5-1F (5'-CGA-CCC GGCCAACTACTTTGA-3') 與 B3-1R (5'-GTCTTCCAGTACC ACTACGCC-3') (Rehner *et al.* 2006)，以及增幅 EF1- α (translation elongation factor 1- α) 序列之 EF1-983F (5'-GCYCCYGG-HCAYCGTGAYTTYAT-3') 與 EF1-2218R (5'-ATGACACCRACRGCACRGTGTG-3') (Rehner & Buckley 2005)。其中，ITS 序列增幅反應條件為：94°C 反應 4 min，1 次循環；94°C 反應 30 s、54°C 反應 30 s、72°C 反應 45 s，33 次循環；最後 72°C 反應 7 min，1 次循環。Bloc 與 EF1- α 序列增幅條件除引子黏合 (annealing) 階段調整為 36 次循環外，其餘溫度、時間及循環數均與 ITS 增幅條件相同。所得 PCR 產物以 1.5% agarose gel 與 0.5 \times TBE 緩衝液進行核酸電泳分析，確認 PCR 增幅產物為單一明顯條帶後，產物委託源資生物科技 (Tri-I Biotech Inc., Taipei, Taiwan) 進行核酸定序。其中，Bloc 序列由於長度較長，增加使用 B22U (5'-GTCGCAGCCAGAGCAACT-3')、BRint (5'-AGCATATCGGGCATGACT-GAB822L-3') 及 B822L (5'-AGATTTCGCAACGT-CAACTT-3') 進行定序 (Rehner *et al.* 2006)。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) 基因資料庫進行序列查詢與比對。

白殭菌分離株之親緣關係樹重建

親緣關係樹重建參考 Khonsanit *et al.* (2020) 進行 *Beauveria* 種類分群所使用部分菌株之 ITS、Bloc 及 EF1 序列，將各菌株之序列由 GenBank 資料庫下載後，與本研究菌株之基因序列進行比較 (附錄)。各基因片段先以 ClustalX2 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 (Darriba *et al.* 2012)，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.1.8 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) 之樹型建構。用於 ITS、Bloc 及 EF1 的 DNA 替換模型分別為 GTR + I + G、HKY + G 及 GTR + G。共進行 2 次分析，每次分析 1×10^7 個世代 (generation)，每 10,000 個世代取 1 棵分析，為求分析準確，捨棄前 25% 世代。

不同溫度對白殭菌菌絲生長與孢子發芽之影響

供試菌株之孢子懸浮液均勻塗抹於 PDA 培養 2 d 後，以直徑 5 mm 打孔器切取菌絲塊，並接種至另一個 SDAY 培養基中央，培養基於定溫箱中黑暗培養，處理溫度分別為 15、20、25、30、32 及 34°C。培養 14 d 後，測量菌落直徑，並換算為菌絲每日周徑生長速率 (mm d^{-1})。每處理 5 重複，試驗重複 2 次。為觀察溫度對測試菌株孢子發芽之影響，另將供試菌株培養於 PDA 培養基 14 d 後，以 0.02% Tween 20 水溶液將分生孢子懸浮，並以血球計數器計算後調整孢子濃度至 1×10^6 conidia mL^{-1} 。將 50 μ L 孢子懸浮液以 L 型玻璃棒均勻塗抹在 PDA 培養基上後，將培養基置於定溫箱黑暗培養，處理溫度分別為 15、20、25、30、32 及 34°C。培養 24 h 後，以解剖顯微鏡 (Nikon SMA 1500, Nikon, Tokyo, Japan) 觀察

每皿培養基中分生孢子發芽情形，發芽管長度大於孢子寬度的 2 倍則記為發芽，並計算每百顆孢子發芽率。每處理 4 重複，試驗重複 2 次。

白殭菌對咖啡果小蠹雌蟲之致病力

供試昆蟲

咖啡果小蠹以人工飼料大量飼養，飼料配方參考 Vega *et al.* (2011)，以 20 mL 玻璃管為飼料容器，每管添加 6 mL 飼料。飼養環境條件為定溫 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ， $85 \pm 5\%$ 相對溼度 (relative humidity; RH)，無光源。初始蟲源採集自雲林縣古坑鄉咖啡園，雌蟲經次氯酸鈉稀釋液消毒後，置於含人工飼料之玻璃管，玻璃管口再以滅菌棉花塞住以防汙染。

生物檢定

供試菌株以 PDA 培養 2 wk，將分生孢子以 0.02% Tween 20 水溶液配製為孢子懸浮液 (1×10^7 conidia mL^{-1})。在直徑 6 cm 培養皿內放入直徑 5.5 cm 無菌圓形濾紙，再將 200 μL 孢子懸浮液滴於濾紙上，再於培養皿中放入 10 隻人工飼養咖啡果小蠹雌蟲，於 25 或 32 $^\circ\text{C}$ 定溫箱全暗環境飼養。自試驗首日起，每日觀察並記錄咖啡果小蠹存活狀況，死亡蟲體則取出並個別置於 1.5 mL 離心管，以確認蟲體後續是否產生白殭菌孢子，每處理共 6 重複。另以 200 μL 0.02% Tween 20 水溶液替代孢子懸浮液作為對照處理。

統計分析

試驗數據分析透過 RStudio (ver. 2022.07.2 Build 576) 執行。為檢定「溫度」與「菌株」因子，對菌絲生長速率與孢子發芽之影響，先將試驗數據套用於廣義線性模型 (generalized linear model; GLM)，採二項式分布 (binomial distribution)，由似然比檢定 (likelihood-ratio test) 分析因子顯著性。若因子具顯著影響力，則以相同方式檢定單一溫度下「菌株」因子顯著性，若菌株間存在顯著差異，再經 Tukey's honestly significant difference test (Tukey's HSD test) 進行事後檢定，比較各菌株間差異 (Tukey's HSD test 經由 "emmeans" 套件執行)。白殭菌致病力評估試驗數據以存活分析

(survival analysis) 處理，將雌蟲每日存活數據以 Kaplan-Meier 法 (Kaplan-Meier method) 建構存活曲線模型，再檢定「菌株」因子對於存活曲線之影響力 (survival analysis 相關函數經由 "survival" 套件執行)，對照組數據不列入統計。若檢定結果顯著則進一步以 Tukey's HSD test 比較各菌株間存活曲線之差異。上述檢定顯著水準皆訂為 0.05 ($\alpha = 0.05$)。

結果

白殭菌田間自然發生率調查

田間咖啡果小蠹死亡率與白殭菌感染咖啡果小蠹之自然發生率如圖 1 所示。於雲林古坑試區，咖啡蟲蛀果內咖啡果小蠹雌蟲之死亡率 2.2–33.3% (平均 11.6%)，雌蟲死亡個體中感染白殭菌之比例 0.0–13.3% (平均 3.1%)，整體上占雌蟲死亡率之 27.1%，又以 3–6 月為白殭菌盛行期 (感染率 3.3–13.3%)，該期間平均 70.0% 雌蟲死亡個體皆感染白殭菌，而自 7 月後白殭菌感染情形逐漸減少，8 月與 11–12 月未見染菌蟲體，僅 9–10 月觀察到零星感染個體。於南投仁愛試區，咖啡果小蠹死亡率介於 12.2–84.4% (平均 50.9%)，雌蟲感染白殭菌比例介於 0.0–4.9% (平均 0.6%)，僅 4–5 月與 11–12 月可見少量白殭菌自然感染情形。

白殭菌之分離與鑑定

本研究由各地咖啡園採集之染病咖啡果小蠹蟲體共分離 98 株白殭菌分離株，挑選其中 7 株並與由甘藷蟻象與荔枝椿象所分離之 3 株白殭菌共同進行培養形態觀察。結果顯示所測試的 10 株白殭菌分離株，培養於 SDAY 培養基上生長均緩慢，菌落表面呈綿毛狀，為白色至淡黃色，培養基背面則各菌株間均呈不同深淺的黃色 (圖 2)。其分生孢子均為球形或橢圓形，經顯微鏡以 1,000 \times 觀察測量分離株 B015、B025、B039、B068、B070 及 B102 之分生孢子大小，分別為 $2.55 \pm 0.05 \mu\text{m} \times 2.19 \pm 0.04 \mu\text{m}$ 、 $2.64 \pm 0.05 \mu\text{m} \times 2.38 \pm 0.04 \mu\text{m}$ 、 $2.26 \pm 0.03 \mu\text{m} \times 1.92 \pm 0.03 \mu\text{m}$ 、 $2.47 \pm 0.03 \mu\text{m} \times 2.16 \pm 0.03 \mu\text{m}$ 、 $2.71 \pm 0.03 \mu\text{m} \times 2.35 \pm 0.03 \mu\text{m}$ 及 $2.33 \pm 0.04 \mu\text{m} \times 1.96 \pm 0.03$

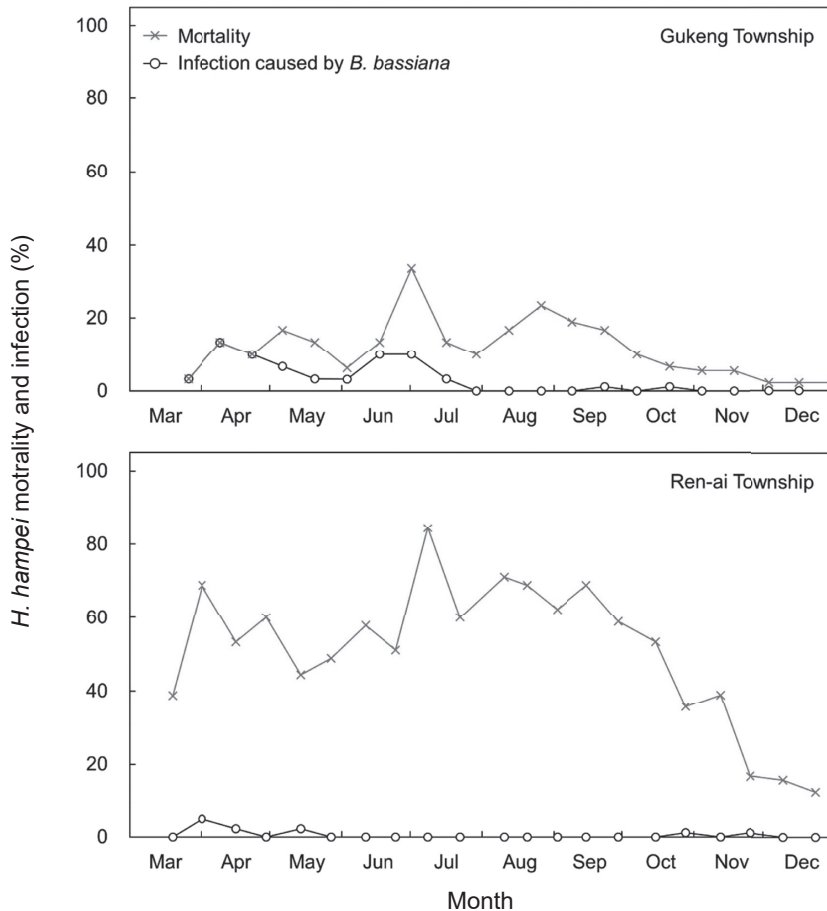


圖 1. 田間咖啡果小蠹死亡率與白殭菌感染率之變化。

Fig. 1. The mortality of *Hypothenemus hampei* and the infection rate by *Beauveria bassiana* in the field.

μm 。分生孢子梗無隔膜，產孢細胞呈短球狀或長頸瓶狀（圖 3）。

分子生物學鑑定與親緣關係

白殭菌分離株以 ITS、EF1- α 及 Bloc 專一性引子對增幅後，其增幅片段大小分別約為 593、1,000 及 1,500 bp，透過此 3 個基因序列重建之親緣關係樹如圖 4 所示。7 株分離自咖啡果小蠹菌株、3 株分離自甘藷蟻象及荔枝椿象菌株，皆被歸類於 *B. bassiana* 分支 (clade)，貝氏分析事後機率值 (Bayesian posterior probability) 為 100%。再按序列差異性，10 株分離株可歸於 3 個不同小分支，7 株自咖啡果小蠹分離菌株與 1 株自甘藷蟻象分離菌株分屬於

2 個小分支，另分離自荔枝椿象菌株 B098 與 B102 則獨立於其它供試菌株。

不同溫度下菌絲生長速率與孢子活性

不同溫度下白殭菌分離株菌絲生長速率如表 1 所示。除了分離株 B025、B098 及 B102 以 25°C 為菌絲生長較佳溫度外，其餘菌株之菌絲生長率均以 30°C 為生長最佳溫度。於 25°C 培養下，所有測試菌株每日菌絲生長率介於 2.39–3.37 mm，其中分離株 B025 生長速率 3.37 mm d⁻¹ 顯著高於其它菌株。而於 30°C 培養下，除了分離株 B025 菌絲生長速率略為降低至 3.23 mm d⁻¹ 以及分離株 B098 與 B102 顯著降低至 1.60 mm d⁻¹ 與 1.51 mm d⁻¹ 外，其餘

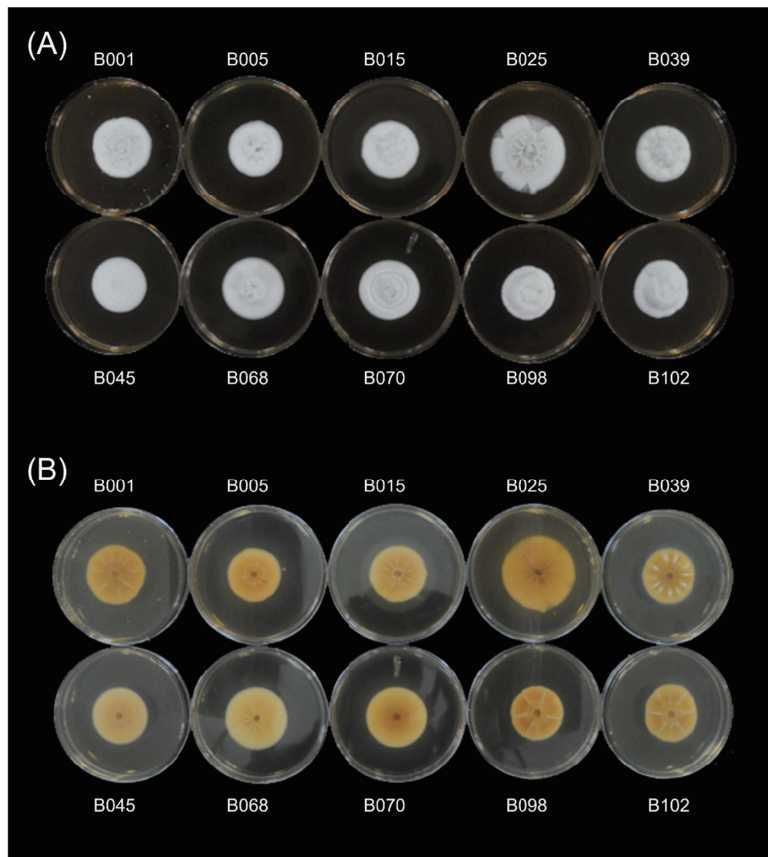


圖 2. 白殭菌分離株培養於 SDAY 培養基上 14 d (25°C) 之菌落形態。(A) 正面與 (B) 背面。

Fig. 2. Colony morphology of the *Beauveria bassiana* isolates cultured on Sabouraud dextrose agar with yeast extract for 14 d. (A) top view and (B) reverse view.

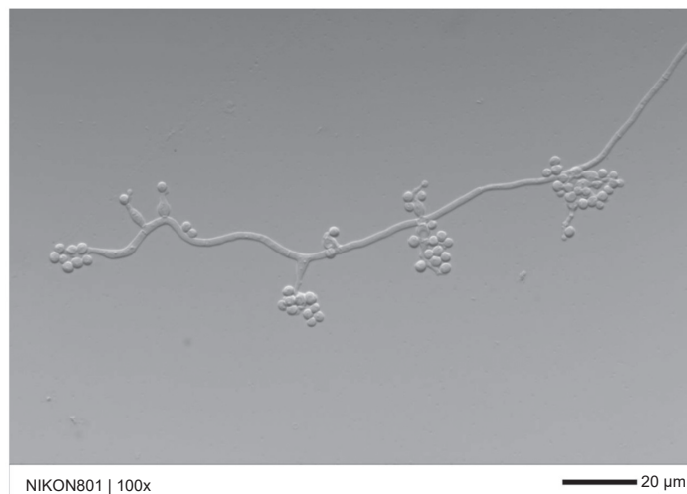


圖 3. 白殭菌分離株 B068 之分生孢子梗與分生孢子 (比例尺 = 20 μm)。

Fig. 3. The conidiogenous structures and the conidia of *Beauveria bassiana* isolate B068 (bar = 20 μm).

Isaria cicadae ARSEF7260

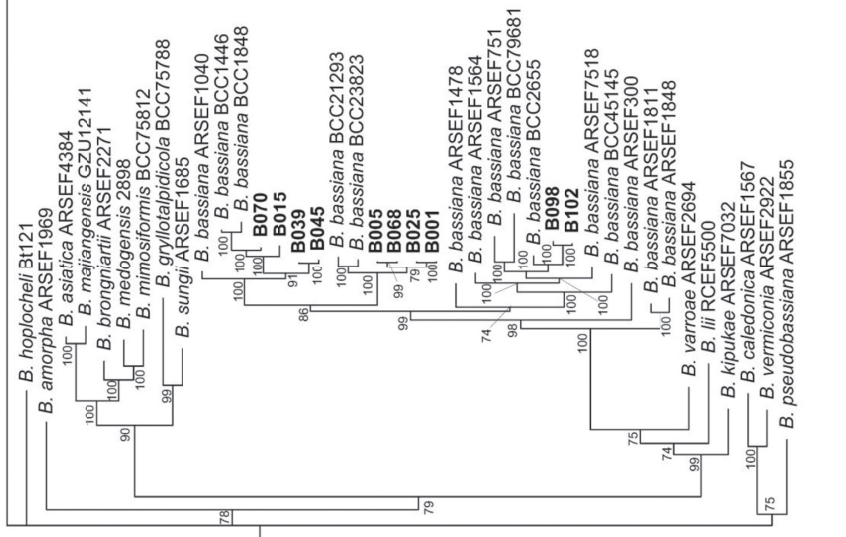


圖 4. 使用 ITS、EF1- α 及 Bloc 序列對本研究與 GenBank 資料庫之 *Beauveria* 菌株以貝氏演算法進行多基因類緣分析之結果。節點之數字表示貝氏分析之事後機率值。使用 *Isaria cicadae* ARSEF7260 之序列作為外群。本研究試驗之菌株以粗體字顯示。

Fig. 4. The Bayesian phylogenetic tree of *Beauveria* isolates from this study and GenBank database. The phylogenetic tree was built using concatenated sequences of partial internal transcribed spacer, translation elongation factor 1- α , and B locus. The Bayesian posterior probabilities are indicated next to the nodes. The tree is rooted by *Isaria cicadae* ARSEF7260. Isolates from this study are emphasized in bold.

表 1. 白殭菌分離株於不同溫度下之菌絲生長速率。

Table 1. Mycelial radial growth rate of *Beauveria bassiana* isolates.

Isolate	Mycelial growth rate (mm d ⁻¹)					
	15°C	20°C	25°C	30°C	32°C	34°C
B001	1.55 f ²	2.08 bcd	2.64 ab	2.81 c	2.06 de	0.76 bc
B005	1.26 abc	1.91 ab	2.39 a	2.52 b	1.82 c	0.93 de
B015	1.19 ab	1.91 abc	2.51 ab	3.05 d	2.13 ef	0.80 cd
B025	1.32 cd	2.09 cd	3.37 c	3.23 e	2.06 de	0.63 b
B039	1.16 a	1.86 a	2.59 ab	2.99 d	2.24 f	1.03 e
B045	1.19 ab	2.11 d	2.65 ab	3.09 d	2.14 ef	0.71 bc
B068	1.32 cd	2.15 de	2.81 b	2.99 d	1.99 d	0.97 e
B070	1.29 bc	2.11 d	2.41 a	2.78 c	0.99 b	0.00 a
B098	1.51 ef	2.24 de	2.50 ab	1.60 a	0.41 a	0.00 a
B102	1.41 de	2.30 e	2.63 ab	1.51 a	0.50 a	0.00 a

² Values within a column followed by the same letter are not significantly different by Tukey's HSD test at 5% level.

菌株於 30°C 培養時，其菌絲生長速率均較 25°C 快速，約為 2.52–3.09 mm d⁻¹。而所有測試菌株於 32°C 培養下，其菌絲生長速率均低於 30°C 之培養；於 34°C 培養時，分離株 B070、B098 及 B102 之菌絲完全無法生長，其餘分離株菌絲生長速率亦僅 0.63–1.03 mm d⁻¹。

不同溫度下白殭菌分離株孢子發芽率如表 2 所示。於 15°C 環境下，除了分離株 B102 有 69.8% 的孢子發芽率，其餘菌株的發芽率均介於 0.0–39.8%。於 20°C 時，分離株 B005、B025 及 B102 孢子發芽率分別為 84.5%、87.5% 及 91.3%，明顯高於其它菌株外，其餘測試菌株的發芽率介於 54.0–80.5%。於 25 與 30°C，所有測試菌株均可達 90% 以上的發芽率，各菌株之間無顯著差異，然於 32°C 下，除了分離株 B005 與 B025 仍可維持 90% 以上的發芽率外，其餘菌株發芽率介於 12.8–87.8%，均明顯低於 30°C 處理之孢子發芽率，其中分離株 B102 孢子發芽率下降幅度最大，發芽率 12.8%。於 34°C 下則除了分離株 B005 與 B068 分別有 14.5% 與 7.3% 的極低發芽率外，其餘菌株之分生孢子已完全不發芽。

白殭菌對咖啡果小蠹之室內致病力評估

白殭菌分離株室內致病力評估結果如圖 5 所示。試驗對照處理雌蟲於 25°C 與 32°C 下皆未死亡。於環境溫度 25°C 下，分離自咖啡果小

蠹菌株對於此蟲雌蟲皆有良好的致病力，接種後第 6 日可造成半數以上雌蟲死亡 (平均死亡率 58.3–78.3%)，接種後第 7 日雌蟲平均死亡率達 96.7–100.0%，惟對照菌株 B098 與 B102 的致病力較差，雌蟲於第 7 日死亡率僅 41.7–70.0%。統計分析結果顯示，咖啡果小蠹雌蟲於接種不同白殭菌分離株之每日存活曲線間存在顯著差異 ($P < 0.05$)，接種分離自咖啡果小蠹菌株 (B005、B015、B025、B039、B045、B068 及 B070) 雌蟲存活率較低，顯著低於接種對照菌株者 (B098 與 B102) ($P < 0.05$)，但與對照菌株 B001 間無顯著差異。7 支菌株間以分離株 B005 表現的存活率顯著低於分離株 B015，其餘菌株兩兩間無顯著差異。另於環境溫度 32°C 下，依據 10 支菌株於第 8 日的致病力表現，以分離株 B068 致病力表現最佳，分離株 B039 次之 (平均死亡率分別為 76.7% 與 71.7%)，而以分離株 B102 表現最差 (平均死亡率為 8.3%)，其餘菌株所造成之死亡率則介於 11.7–66.7%。統計分析結果顯示，菌株差異對於寄主存活表現具顯著影響 ($P < 0.05$)。不同菌株於寄主存活表現以接種分離株 B068 的雌蟲存活率顯著低於分離株 B015、B045、B098 及 B102，而分離株 B005 與 B039 皆與分離株 B015、B045 及 B102 具顯著差異，其餘比較結果則如圖 5 所示。

表 2. 溫度對白殭菌分離株孢子發芽之影響。

Table 2. Effect of temperature on the spore germination rate (%) of *Beauveria bassiana* isolates.

Isolate	Spore germination rate (%) ^z					
	15°C	20°C	25°C	30°C	32°C	34°C
B001	0.0 a ^y	54.0 a	97.0 ab	96.3 bcd	80.8 f	0.0 a
B005	39.8 d	84.5 efg	97.8 ab	98.5 d	98.0 g	14.5 c
B015	0.0 a	67.8 bc	95.0 a	94.0 abc	48.0 cd	0.0 a
B025	17.5 c	87.5 fg	99.5 b	98.8 d	94.3 g	0.0 a
B039	7.3 b	64.8 ab	95.3 a	90.5 a	51.3 de	0.0 a
B045	0.0 a	76.3 cde	94.8 a	93.3 ab	32.0 b	0.0 a
B068	10.3 bc	80.5 def	99.5 b	98.0 cd	87.8 f	7.3 b
B070	34.3 d	74.3 bcd	98.5 ab	96.3 bcd	39.3 bc	0.0 a
B098	13.5 bc	78.0 de	98.5 ab	95.8 abcd	59.5 e	0.0 a
B102	69.8 e	91.3 g	96.8 ab	93.3 ab	12.8 a	0.0 a

^z Spore germination rate (%) = No. of germinating spores on potato dextrose agar/100 spores.

^y Values within a column followed by the same letter are not significantly different by Tukey's HSD test at 5% level.

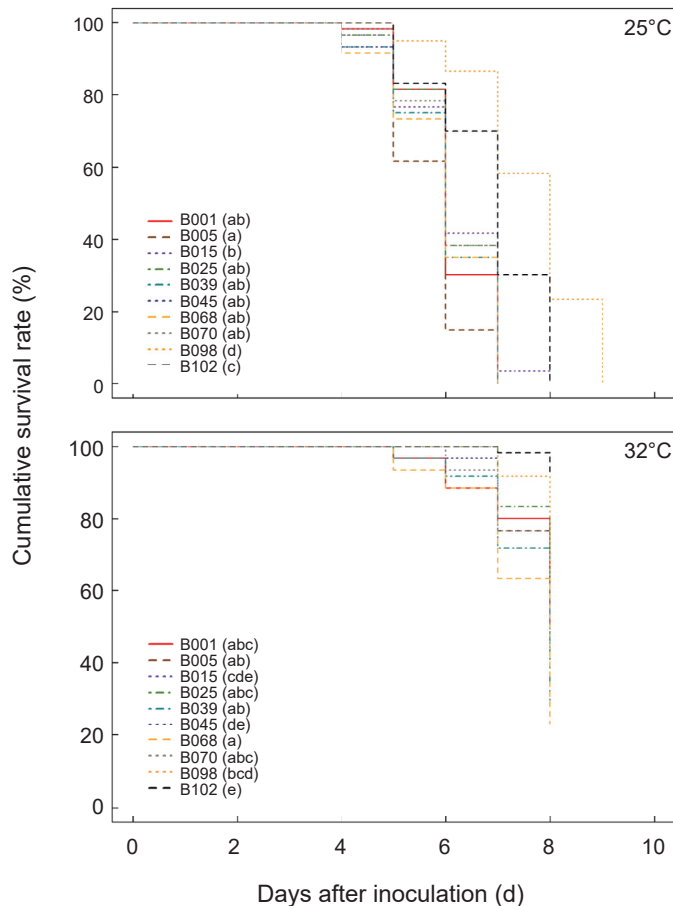


圖 5. 25°C與32°C下咖啡果小蠹雌蟲接種不同白殭菌分離株之累積存活率。

Fig. 5. Cumulative survival rate of *Hypothenemus hampei* females inoculated with different isolates of *Beauveria bassiana* at 25°C and 32°C.

討論

透過本研究於台灣多處咖啡果園之調查，顯示國內許多咖啡產區皆有自然發生白殭菌族群，惟白殭菌盛行率隨地理環境與田間管理模式等因素而有所不同。國內過往未曾有針對咖啡果小蠹調查白殭菌田間自然發生率之研究報告，而根據本研究於 2021 年之調查，古坑試區白殭菌感染咖啡果小蠹雌蟲最高達 13.3%，而仁愛試區感染率最高僅 4.9%。按 Vega *et al.* (2015a) 回顧各國白殭菌於咖啡果小蠹最高感染率紀錄，不同地區白殭菌感染率變化甚大，於喀麥隆的田間感染率高達 71%，在尼加拉瓜、哥倫比亞及厄瓜多的感染率則介於 30–44%，在巴西與波多黎各的感染率皆小於 1%。事實上，白殭菌易受溫度、濕度及光照量等環境因子所影響 (Inglis *et al.* 2001; Staver *et al.* 2001; Pell *et al.* 2010; Vera *et al.* 2011; Mascarin & Jaronski 2016)，以至於各地白殭菌自然發生率不盡相同。許多文獻皆指出涼爽、高濕及低日照遮陰環境適合白殭菌的發生 (Damon 2000; Sanchez *et al.* 2013; Wraight *et al.* 2021)，但亦有少數研究並未觀察到白殭菌感染率與溫濕度等環境因子的相關性 (De La Rosa *et al.* 2000; Monzón *et al.* 2008)。另有研究報告指出，不同海拔 (約 100–700 m) 咖啡園之白殭菌感染率具差異，白殭菌自然感染率隨海拔上升而增加 (Greco *et al.* 2018; Wraight *et al.* 2018)。

本研究於咖啡產季前期 (3–6 月)，在兩試區所調查咖啡果小蠹死亡率與白殭菌自然發生率具明顯差異。古坑試區因未施用殺蟲劑，故雌蟲死亡率較低，此與前人研究相似 (Aristizábal *et al.* 2017; Greco *et al.* 2018)。該期間白殭菌感染率變化介於 3.3–13.3%，接近 Greco *et al.* (2018) 在夏威夷調查之白殭菌自然發生率 (2.3–23.0%)。而在仁愛試區呈現高死亡率與低感染率，該田間由於定期施藥防治害蟲，故導致咖啡果小蠹死亡率偏高。另造成白殭菌自然發生率較低的原因，除前段提及之溫度與濕度等環境因子差異外，藥劑施用與否亦為關鍵因素。如常見的鋅錳乃浦與氧化銅等殺菌劑，即對白殭菌的菌絲生長或孢子發芽具有抑制作用 (Kouassi *et al.* 2003; Roberti *et al.*

2017)。Kouassi *et al.* (2003) 曾以美國牧草盲蝽 (*Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois)) 測試混用殺菌劑對白殭菌感染力的影響，研究顯示於白殭菌施用前 2–4 d 以殺菌劑先行處理盲蝽，白殭菌感染率則顯著降低，同時施用白殭菌與殺菌劑亦對白殭菌感染率具負面影響。除此，某些殺蟲劑與殺草劑市售商品於一定濃度下，亦會對白殭菌侵染造成負面影響 (Usha *et al.* 2014; Celar & Kos 2016)。因此，未來若同時施用白殭菌與其它農藥時，應考量該些藥劑對白殭菌的影響，以避免影響白殭菌於田間殺蟲效果 (Kawabata *et al.* 2020)。

據本研究調查結果，白殭菌田間發生時期以 3–6 月為主，此時相對應之咖啡物候期為小果至中果期，按本團隊於台灣幾處咖啡產區 (古坑鄉與仁愛鄉等) 調查結果 (未發表資料)，此時亦為國內咖啡果小蠹開始危害咖啡果的主要時間點。一般於咖啡果小蠹危害初期，由於雌蟲仍位於蛀孔附近而尚未蛀入深處，故此時期蟲體較易受白殭菌感染 (Greco *et al.* 2018)。相似的發現亦見於 Wraight *et al.* (2018) 之研究，該篇作者指出於夏威夷之咖啡產季初期，可在某些園區觀察到相當高的白殭菌自然感染率；儘管如此，該些園區果實蟲蛀率仍逾當地建議防治基準，顯示無法單獨仰賴田間白殭菌族群有效地抑制害蟲發生。因此，額外施用白殭菌仍為咖啡果小蠹防治策略中的重要一環。關於白殭菌施用時機，夏威夷當地建議在咖啡產季前期視蟲害發生狀況施用白殭菌，在果實蟲蛀率尚未超過 3%，且 25% 以上雌蟲仍未蛀入咖啡胚乳 (咖啡豆) 之時為較佳的時間點 (Hollingsworth *et al.* 2020)。故未來台灣也應建立適用本土咖啡產業之防治基準，以作為白殭菌一類防治資材使用時機之依據。

由於白殭菌屬的分生孢子形態具有重疊性，導致該屬缺乏精確可供辨識種間的形態特徵，因此在種的鑑定上仍需以核酸分析進行。本研究所測試 10 個白殭菌菌株經序列分析後均為 *B. bassiana*，但其中仍可分出 3 個小分支，7 個從咖啡果小蠹分離之菌株在分支上顯然並無地理來源之相關性，而從親緣關係圖顯示荔枝椿象分離菌株歸在一個不同於咖啡果小蠹分離株的小分支，此差異性是否與白殭菌分

離寄主來源不同有關，則仍需進一步收集更多寄主來源的菌株加以分析證明。

白僵菌菌株對溫度之感受性亦隨菌株不同而有差異，過去已有研究顯示，多數 *B. bassiana* 菌株最佳生長溫度在 25–28°C 之間，大多數菌株於 30°C 生長受阻，35°C 則完全無法生長 (Parker *et al.* 2003)。本研究考量白僵菌實際應用所面臨的環境條件，需篩選具高溫耐受性的本土白僵菌菌株，試驗結果顯示不同菌株對溫度耐受性具顯著差異，自咖啡果小蠹分離白僵菌菌株當中，以 B025 菌株菌絲生長速度較快且適合生長溫度範圍較廣，於 25°C 與 30°C 菌絲生長速率均為 3 mm d⁻¹ 以上，而其餘分離株則以 30°C 為較適合生長溫度，此與 Parker *et al.* (2003) 收集白僵菌菌株溫度適應範圍具有明顯的差異性。另由荔枝椿象分離白僵菌於高溫環境生長速率慢，以 20–25°C 為較適生長溫度，此與咖啡果小蠹分離株有所差異。孢子發芽率試驗結果顯示，各分離株以 25–30°C 為較適孢子發芽溫度 (發芽率皆達 90% 以上)，且多數孢子發芽率隨著溫度增加至 32°C 與 34°C 而顯著降低。在 32°C 環境下仍具良好孢子發芽率者為分離株 B001、B005、B025 及 B068 (發芽率 80.8–98.0%)，其餘分離株發芽率僅 12.8–59.5%。當溫度上升至 34°C，僅有分離株 B005 與 B068 仍有極少數孢子發芽 (發芽率 7.3–14.5%)，其餘分離株孢子皆無法順利發芽。由於各菌株的生長與發芽對溫度的感受性不盡相同，未來在選擇菌株進一步開發時，應根據環境選擇最適合的菌株，以達最佳的防治效果。

找尋具開發潛力白僵菌分離株為本研究主要目的之一，由於台灣環境為高溫多濕，因此於高溫環境下菌株致病力表現為篩選關鍵。於本研究，多數供試菌株在 25°C 環境下的致病力皆相當，於接種後第 7 日可達 100% 致死率，但於 32°C 高溫環境下，僅以分離株 B005、B039 及 B068 之致病力較佳。儘管白僵菌為寄主範圍極廣的蟲生真菌，被應用在防治多種害蟲 (Zimmermann 2007)，但各菌株間對於相同寄主的致病力仍存在差異。Bayman *et al.* (2021) 曾比較波多黎各本土白僵菌分離株的致病力，29 支分離株之中，部分菌株與市

售商品 Mycotrol® 白僵菌 GHA 品系於 24°C 下皆具有良好的殺蟲效果 (致死率 > 80%)，但亦有少數菌株致死率未達 50%。由此可知，各菌株儘管皆分離自咖啡果小蠹，但仍可能因採集地點環境等因素，以致不同分離株致病力表現呈現顯著差異。此外，源自不同寄主分離株對於咖啡果小蠹致病力亦不盡相同，2 支分離自荔枝椿象菌株於室內生物檢定試驗之致病力並不理想，此為本研究值得留意的一項結果。根據 Bayman *et al.* (2021) 之田間試驗，本土採集分離株於田間的感染率與持效性表現皆優於市售商品菌株，儘管該些本土菌株與市售菌株於室內生物檢定下表現並無顯著差異，該文獻推測由於菌株 GHA 係分離自美國奧勒岡 (Oregon)，因此該品系或許較不耐波多黎各當地濕熱的咖啡園環境，以至於菌株在田間表現效果較差。

目前我國已核准蟲生真菌之微生物農藥較少，市面上僅 1 種核准於防治十字花科蔬菜小菜蛾的白僵菌商品，而該藥劑未公告於防治咖啡果小蠹，現行亦無登記或延伸使用藥劑可供防治咖啡果小蠹使用，且本研究已顯示不同白僵菌分離株對果小蠹的致病力有顯著差異，例如由荔枝椿象分離之分離株對咖啡果小蠹致病力效果較差。因此，亟需篩選出適合本土咖啡產區環境之高致病力白僵菌分離株以供咖啡產業應用。本研究經室內菌株篩選，目前已篩選 B068 等分離株為具開發潛力菌株，將續以田間試驗與量產試驗作進一步實用性評估。此外，因白僵菌受日照與溫度等因子影響甚大，透過製劑可有效提升白僵菌田間防蟲效果 (de Oliveira *et al.* 2018; Melo *et al.* 2020)，故將候選分離株製劑為耐受環境之產品，亦為本團隊未來研究方向之一，期望藉由以上研究，未來能開發適合台灣咖啡栽培使用防治咖啡果小蠹之本土白僵菌產品，裨益咖啡產業發展。

引用文獻

- Aristizábal, L. F., M. Jiménez, A. E. Bustillo, and S. P. Arthurs. 2011. Monitoring cultural practices for coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) management in a small coffee farm in Colombia. *Fla. Entomol.* 94:685–

687. doi:10.1653/024.094.0334
- 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.* 3:1–5. 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
- Aristizábal, L. F., M. Johnson, S. Shriner, R. Hollingsworth, N. C. Manoukis, R. Myers, P. Bayman, and S. P. Arthurs. 2017. Integrated pest management of coffee berry borer in Hawaii and Puerto Rico: Current status and prospects. *Insects* 8:123. doi:10.3390/insects8040123
- Baker, P. S., J. F. Barrera, and A. Rivas. 1992. Life-history studies of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*, Scolytidae) on coffee trees in southern Mexico. *J. Appl. Ecol.* 29:656–662. doi:10.2307/2404473
- Bayman, P., Y. A. Mariño, N. M. García-Rodríguez, O. F. Oduardo-Sierra, and S. A. Rehner. 2021. Local isolates of *Beauveria bassiana* for control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* in Puerto Rico: Virulence, efficacy and persistence. *Biol. Control* 155:104533. doi:10.1016/j.biocontrol.2021.104533
- Benavides, P., C. Góngora, and A. Bustillo. 2012. IPM program to control coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, with emphasis on highly pathogenic mixed strains of *Beauveria bassiana*, to overcome insecticide resistance in Colombia. p.512–540. *in*: Insecticides-Advances in Integrated Pest Management. (Perveen, F. K., ed.) InTech Europe. Rijeka, Croatia. 724 pp.
- Bustillo, A. E., R. Cardenas, D. A. Villalba, P. Benavides, J. Orozco, and F. J. Posada. 1998. Manejo Integrado de la Broca del Café: *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia. 134 pp. (in Spanish)
- Bustillo, A. E., M. G. Bernal, P. Benavides, and B. Chaves. 1999. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. *Fla. Entomol.* 82:491–498. doi:10.2307/3496468
- Celar, F. A. and K. Kos. 2016. Effects of selected herbicides and fungicides on growth, sporulation and conidial germination of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Pest Manag. Sci.* 72:2110–2117. doi:10.1002/ps.4240
- Cure, J. R., D. Rodríguez, A. P. Gutierrez, and L. Ponti. 2020. The coffee agroecosystem: Bio-economic analysis of coffee berry borer control (*Hypothenemus hampei*). *Sci. Rep.* 10:12262. doi:10.1038/s41598-020-68989-x
- 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
- Davis, A. P., R. Govaerts, D. M. Bridson, and P. Stoffelen. 2006. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 152:465–512. doi:10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x
- de Faria, M. R. and S. P. Wraight. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control* 43:237–256. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.08.001
- De La Rosa, W., R. Alatorre, J. F. Barrera, and C. Toriello. 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 Oliveira, D. G. P., R. B. Lopes, J. M. Rezende, and I. Delalibera. 2018. Increased tolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia to high temperature provided by oil-based formulations. *J. Invertebr. Pathol.* 151:151–157. doi:10.1016/j.jip.2017.11.012
- Dufour, B. P., I. W. Kerana, and F. Ribeyre. 2021. Population dynamics of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) according to the phenology of *Coffea arabica* L. in equatorial conditions of North Sumatra. *Crop Prot.* 146:105639. doi:10.1016/j.cropro.2021.105639
- Escobar-Ramírez, S., I. Grass, I. Armbrrecht, and T. Tschardtke. 2019. Biological control of the coffee berry borer: Main natural enemies, control success, and landscape influence. *Biol. Control* 136:103992. doi:10.1016/j.biocontrol.2019.05.011
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. n.d. <https://www.fao.org/statistics> (visit on 2/18/2023)
- Góngora, C. E., P. Marín, and P. Benavides-Machado. 2009. Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. *Avances técnicos Cenicafé* 384:1–8. (in Spanish)
- Greco, E. B., M. G. Wright, J. Burgueño, and S. T.

- Jaronski. 2018. Efficacy of *Beauveria bassiana* applications on coffee berry borer across an elevation gradient in Hawaii. *Biocontrol Sci. Technol.* 28:995–1013. doi:10.1080/09583157.2018.1493088
- Guyot, R., P. Hamon, E. Couturon, N. Raharimalala, J. J. Rakotomalala, S. Lakkanna, S. Sabatier, A. Afouard, and P. Bonnet. 2020. WCSdb: A database of wild *Coffea* species. *Database* 2020:baaa069. doi:10.1093/database/baaa069
- Hollingsworth, R. G., L. F. Aristizábal, S. Shriner, G. M. Mascarin, R. de Andrade Moral, and S. P. Arthurs. 2020. Incorporating *Beauveria bassiana* into an integrated pest management plan for coffee berry borer in Hawaii. *Front. Sustain. Food Syst.* 4:22. doi:10.3389/fsufs.2020.00022
- Inglis, G. D., M. S. Goettel, T. M. Butt, and H. Strasser. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. p.23–69. *in*: *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potentials.* (Butt T. M., C. W. Jackson, and N. Magan, eds.) CABI Publ. Wallingford, UK. 390 pp. doi:10.1079/9780851993560.0023
- Johnson, M. A., C. P. Ruiz-Diaz, N. C. Manoukis, and J. C. Verle Rodrigues. 2020. Coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*), a global pest of coffee: Perspectives from historical and recent invasions, and future priorities. *Insects* 11:882. doi:10.3390/insects11120882
- Kawabata, A. M., S. T. Nakamoto, M. Miyahira, and R. T. Curtiss. 2020. Recommendations for coffee berry borer integrated pest management in Hawai'i 2020. College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa. <https://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/IP-47.pdf> (visit on 2/18/2023)
- Khonsanit, A., J. J. Luangsa-Ard, D. Thanakitpipattana, W. Noisripoom, T. Chaitika, and N. Kobmoo. 2020. Cryptic diversity of the genus *Beauveria* with a new species from Thailand. *Mycol. Prog.* 19:291–315. doi:10.1007/s11557-020-01557-9
- Kouassi, M., D. Coderre, and S. I. Todorova. 2003. Effects of the timing of applications on the incompatibility of three fungicides and one isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina). *J. Appl. Entomol.* 127:421–426. doi:10.1046/j.1439-0418.2003.00769.x
- 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
- Leung, P. S., A. Kawabata, and S. T. Nakamoto. 2014. Estimated economy-wide impact of CBB for the crop years 2011/12 and 2012/13. Brief Report at Request of Hawaii Congressional Delegation. https://www.hawaiicoffeeed.com/uploads/2/6/7/7/26772370/estimated_economic_impact_of_cbb_in_hawaii.pdf (visit 2/18/2023)
- Lin, M. Y., Y. F. Wu, and S. K. Chen. 2010. Monitoring survey of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, and its control in the field. *Res. Bull. TNDARES* 56:35–44. (in Chinese with English abstract) doi:10.29558/XLZY.201012.0004
- Mariño, Y. A., V. J. Vega, J. M. García, J. C. Verle Rodrigues, N. M. García, and P. Bayman. 2017. The coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae) in Puerto Rico: Distribution, infestation, and population per fruit. *J. Insect Sci.* 17:58. doi:10.1093/jisesa/iew125
- Mascarin, G. M. and S. T. Jaronski. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32:177. doi:10.1007/s11274-016-2131-3
- Melo, M. R., M. F. Zotarelli, L. D. Santos, and E. Silveira. 2020. Selection of surfactants for enhancing the wettability of powder formulations of *Beauveria bassiana* (bals.-criv.) vuill. (1912) (Ascomycota: Cordycipitaceae). *Biol. Control* 151:104391. doi:10.1016/j.biocontrol.2020.104391
- Monzón, A. J., F. Guharay, and I. Klingen. 2008. Natural occurrence of *Beauveria bassiana* in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) populations in unsprayed coffee fields. *J. Invertebr. Pathol.* 97:134–141. doi:10.1016/j.jip.2007.07.008
- Oliveira, C. M., A. M. Auad, S. M. Mendes, and M. R. Frizzas. 2012. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. *J. Appl. Entomol.* 137:1–15. doi:10.1111/jen.12018
- Parker, B. L., M. Skinner, S. D. Costa, S. Gouli, W. Reid, and M. El Bouhssini. 2003. Entomopathogenic fungi of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae): Collection and characterization for development. *Biol. Control* 27:260–272. doi:10.1016/S1049-9644(03)00017-3
- Pell, J. K., J. J. Hannam, and D. C. Steinkraus. 2010. Conservation biological control using fungal entomopathogens. *BioControl* 55:187–198. doi:10.1007/s10526-009-9245-6
- Rehner, S. A. and E. Buckley. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: Evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. *Mycologia* 97:84–98. doi:10.3852/mycologia.97.1.84
- Rehner, S. A., F. Posada, E. P. Buckley, F. Infante, A.

- Castillo, and F. E. Vega. 2006. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *J. Invertebr. Pathol.* 93:11–21. doi:10.1016/j.jip.2006.04.005
- Rezende, J. B. and M. H. Taniwaki. 2020. Coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae): An opening for fungi and toxins? *Coffee Sci.* 15:e151751. doi:10.25186/v15i.1751
- Roberti, R., H. Righini, A. Masetti, and S. Maini. 2017. Compatibility of *Beauveria bassiana* with fungicides *in vitro* and on zucchini plants infested with *Trialeurodes vaporariorum*. *Biol. Control* 113:39–44. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.06.006
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61:539–542. doi:10.1093/sysbio/sys029
- Ruiz-Cárdenas, R. and P. Baker. 2010. Life table of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in relation to coffee berry phenology under Colombian field conditions. *Sci. Agric.* 67:658–668. doi:10.1590/S0103-90162010000600007
- Sanchez, E., B. P. Dufour, A. P. Olivas, E. D. M. Virginio-Filho, S. Vilchez, and J. Avelino. 2013. Shade has antagonistic effects on coffee berry borer. p.729–736. *in: Proceeding of the 24th International Conference on Coffee Science.* November 12–16, 2012. San José, Costa Rica. ASIC, Paris, France.
- Staver, C., F. Guharay, D. Monterroso, and R. G. Muschler. 2001. Designing pest-suppressive multistrata perennial crop systems: Shade-grown coffee in Central America. *Agrofor. Syst.* 53:151–170. doi:10.1023/A:1013372403359
- Sun, S., Z. Wang, A. Liu, S. Lai, J. Wang, Q. Meng, Y. Gou, A. J. Johnson, and Y. Li. 2020. First record of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) on Hainan Island, China. *Coleopt. Bull.* 74:710–713. doi:10.1649/0010-065X-74.4.710
- Usha, J., M. N. Babu, and V. Padmaja. 2014. Detection of compatibility of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with pesticides, fungicides and botanicals. *Int. J. Plant Anim. Environ. Sci.* 4:613–624.
- 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
- 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:10.1163/1874-98209X12525675906031
- Vega, F. E., M. Kramer, and J. Jaramillo. 2011. Increasing coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) female density in artificial diet decreases fecundity. *J. Econ. Entomol.* 104:87–93. doi:10.1603/ec10353
- Vega, F. E., A. P. Davis, and J. Jaramillo. 2012. From forest to plantation? Obscure articles reveal alternative host plants for the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 107:86–94. doi:10.1111/j.1095-8312.2012.01912.x
- Vega, F. E., F. Infante, and A. J. Johnson. 2015a. The genus *Hypothenemus*, with emphasis on *H. hampei*, the coffee berry borer. p.427–494. *in: Bark Beetles: Biology and Ecology of Native and Invasive Species.* (Vega, F. E. and R. W. Hofstetter, eds.) Academic Press. San Diego, CA. 640 pp. doi:10.1016/B978-0-12-417156-5.00011-3
- Vega, F. E., A. Simpkins, G. Bauchan, J. M. Valdéz-Carrasco, A. Castillo, and F. Infante. 2015b. A mysterious wing spine in male coffee berry borers (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Fla. Entomol.* 98:352–353. doi:10.1653/024.098.0155
- Vega, F. E., L. T. Smith, N. M. J. Davies, J. Moat, T. Góral, R. O’Sullivan, and A. P. Davis. 2019. Elucidation of hosts, native distribution, and habitat of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) using herbaria and other museum collections. *Front. Plant Sci.* 10:1188. doi:10.3389/fpls.2019.01188
- Vega, V. J., Y. A. Mariño, D. Deynes, E. B. Greco, D. E. Bright, and P. Bayman. 2020. A beetle in a haystack: Are there alternate hosts of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) in Puerto Rico? *Agronomy* 10:228. doi:10.3390/agronomy10020228
- Vera, J. T., E. C. Montoya, P. Benavides, and C. E. Góngora. 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
- Villalba-Gault, D. A., A. E. Bustillo-Pardey, and B. Chaves-Cordoba. 1995. Evaluación de insecticidas para el control de la broca del café en Colombia. *Cenicafé* 46:152–163. (in Spanish with English abstract)
- White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. 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, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds.) Academic Press. San Diego, CA. 482 pp. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1
- Woodill, A. J., S. T. Nakamoto, A. M. Kawabata, and P. Leung. 2017. To spray or not to spray: A decision analysis of coffee berry borer in Hawaii. *Insects* 8:116. doi:10.3390/insects8040116
- 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. 2018. 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, R. L. Howes, L. A. Castrillo, M. H. Griggs, R. I. Carruthers, R. H. Smith, T. K. Matsumoto, and L. M. Keith. 2021. Efficacy of *Beauveria bassiana* strain GHA spray applications against coffee berry borer *Hypothenemus hampei* on Hawai'i Island. *Biol. Control* 161:104587. doi:10.1016/j.biocontrol.2021.104587
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Technol.* 17:553–596. doi:10.1080/09583150701309006

附錄. 用於白殭菌親緣分析序列之 GenBank 資料庫登錄碼。

Appendix. GenBank accession numbers for DNA sequences of *Beauveria* spp. used in the phylogenetic analyses.

Species	Isolate	GenBank number ^{xy}		
		ITS	Bloc	EF1- α
<i>Beauveria amorpha</i>	ARSEF1969	AY31998	HQ880738	AY531907
<i>B. asiatica</i>	ARSEF4384	AY532026	HQ880716	AY531935
<i>B. bassiana</i>	ARSEF1040	AY531972	HQ880689	AY531881
<i>B. bassiana</i>	ARSEF1478	AY531981	HQ880695	AY531890
<i>B. bassiana</i>	ARSEF1564	HQ880761	HQ880692	HQ880974
<i>B. bassiana</i>	ARSEF1811	AY531992	HQ880696	AY531901
<i>B. bassiana</i>	ARSEF1848	AY531995	HQ880696	AY531904
<i>B. bassiana</i>	ARSEF300	AY532015	HQ880690	AY531924
<i>B. bassiana</i>	ARSEF751	AY532045	HQ880694	AY531954
<i>B. bassiana</i>	ARSEF7518	HQ880762	HQ880693	HQ880975
<i>B. bassiana</i>	BCC1446	MN401671	MN401541	MN401499
<i>B. bassiana</i>	BCC1848	MN401670	MN401540	MN401498
<i>B. bassiana</i>	BCC21293	MN401654	MN401535	MN401482
<i>B. bassiana</i>	BCC23823	MN401662	MN401536	MN401490

附錄. 用於白僵菌親緣分析序列之 GenBank 資料庫登錄碼。(續)

Appendix. GenBank accession numbers for DNA sequences of *Beauveria* spp. used in the phylogenetic analyses. (continued)

Species	Isolate	GenBank number ^{z,y}		
		ITS	Bloc	EF1- α
<i>B. bassiana</i>	BCC2655	MN401668	MN401538	MN401496
<i>B. bassiana</i>	BCC45145	MN401667	MN401537	MN401495
<i>B. bassiana</i>	BCC79681	MN401669	MN401539	MN401497
<i>B. bassiana</i>	B001	ON417456	ON462318	ON462329
<i>B. bassiana</i>	B005	ON417446	ON462308	ON462319
<i>B. bassiana</i>	B015	ON417447	ON462309	ON462320
<i>B. bassiana</i>	B025	ON417448	ON462310	ON462321
<i>B. bassiana</i>	B039	ON417449	ON462311	ON462322
<i>B. bassiana</i>	B045	ON417450	ON462312	ON462323
<i>B. bassiana</i>	B068	ON417451	ON462313	ON462324
<i>B. bassiana</i>	B070	ON417452	ON462314	ON462325
<i>B. bassiana</i>	B098	ON417453	ON462315	ON462326
<i>B. bassiana</i>	B102	ON417454	ON462316	ON462327
<i>B. brongniartii</i>	ARSEF2271	HQ880779	HQ880710	HQ880988
<i>B. caledonica</i>	ARSEF1567	AY531986	HQ880747	AY531894
<i>B. gryllotalpidicola</i>	BCC75788	MN401623	MN401505	MN401449
<i>B. hoplocheli</i>	Bt121	KC339687	KM453968	KC339704
<i>B. kipukae</i>	ARSEF7032	HQ880803	HQ880734	HQ881005
<i>B. lii</i>	RCEF5500	JN689372	JN689373	JN689371
<i>B. majiangensis</i>	GZU12141	MG052642	MG052639	MG052640
<i>B. medogensis</i>	2898	KU994837	KU994836	KU994833
<i>B. mimosiformis</i>	BCC75812	MN401672	MN401542	MN401500
<i>B. pseudobassiana</i>	ARSEF1855	HQ880796	HQ880727	HQ880999
<i>B. sungii</i>	ARSEF1685	AY531990	HQ880740	AY531899
<i>B. varroae</i>	ARSEF2694	HQ880802	HQ880733	HQ881004
<i>B. vermiconia</i>	ARSEF2922	AY532012	HQ880753	AY531920
<i>Isaria cicadae</i>	ARSEF7260	HQ880826	HQ880757	HQ881017

^z ITS: internal transcribed spacer regions 1 and 2, including the 5.8S ribosomal RNA gene; Bloc: B locus intergenic region; EF1- α : translation elongation factor 1- α .

^y Isolates in boldface were obtained in this study.

Natural Occurrence and Selection of *Beauveria bassiana* Isolates in Coffee Berry Borers in Taiwan

Po-Hung Chen¹, Yu-Ping Liang¹, and Hui-Fang Ni^{2,*}

Abstract

Chen, P. H., Y. P. Liang, and H. F. Ni. 2023. Natural occurrence and selection of *Beauveria bassiana* isolates in coffee berry borers in Taiwan. *J. Taiwan Agric. Res.* 72(3):219–236.

Beauveria bassiana (Bb) is an important microbial biocontrol agent for controlling the coffee berry borer (CBB, *Hypothenemus hampei*) in many countries; however, no commercial Bb product is currently available to the coffee industry in Taiwan. Therefore, the aims of this study were to investigate the natural infection rate of CBB in local coffee orchards, and to screen native Bb isolates as potential control agents against CBB through isolation, identification, and laboratory tests. The results showed that the natural prevalence of Bb varied dramatically among different orchards. In an experimental orchard in Gukeng Township, Yunlin County (extensive farming), the maximum infection rate of female CBB in infested berries was 13.3% (averaged 3.1%). The incidence peaked from March to June, showing 70.0% of dead CBB females were infected with Bb. However, in the other orchard in Ren-ai Township, Nantou County (conventional farming), the infection rate was very low, with a maximum of only 4.9% (averaged 0.6%). To screen isolates with biocontrol potential, a total of 98 isolates were collected from the production areas, including Taichung, Nantou, Yunlin, etc. Seven isolates were selected and identified as Bb by cultural morphology and DNA sequences of internal transcribed spacer, B locus intergenic region, and translation elongation factor 1- α . The mycelial growth rate, spore germination rate, and virulence to CBB varied among isolates at different temperatures. Isolates B005, B025, and B068 were more tolerant to high temperatures, the spore germination rates of which were 98%, 94%, and 88% at 32°C, respectively, while the germination rates of most other isolates were 30–60%. Most isolates had higher virulence to female CBB at 25°C, resulting in a mortality rate of 100% 8 days post-inoculation (dpi). All isolates failed to cause 100% mortality 8 dpi at 32°C, while B005, B039, and B068 had better performance, which caused 67%, 72%, and 77% mortality 8 dpi, respectively. In future research, we will continue screening isolates with biocontrol potential, and formulate Bb products with B068. We hope to develop commercial Bb products that will be suitable for managing CBB in the Taiwanese coffee cultivation system and help to improve the coffee industry.

Key words: Coffee berry borer, *Beauveria bassiana*, Biological control.

Received: February 18, 2023; Accepted: April 7, 2023.

* Corresponding author, email: hfni@tari.gov.tw

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

² Associate Research Fellow and Division Director, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.