

落叶松八齿小蠹伴生致病菌的特异性快速检测

刘学伟^{1,2,3}, 王 正^{1,2}, 吕 全^{1,2}, 张雪萍⁴, 王秀芹⁵, 孔祥波², 张星耀^{1,2}

(1. 南京林业大学 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037; 2. 中国林业科学研究院 森林生态环境与保护研究所 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091; 3. 天津市武清区林业局, 天津 301700; 4. 海拉尔国家森林公园, 内蒙古 海拉尔 021000; 5. 辽宁省朝阳师范高等专科学校 生化工程系, 辽宁 朝阳 122000)

摘要: 落叶松八齿小蠹 *Ips subelongatus* 严重危害落叶松 *Larix* spp. 林, 造成了巨大的经济和生态损失, 被列为中国林业危险性有害生物。长喙壳类真菌(ophiostomatoid fungi)是小蠹虫伴生菌中的最主要类群, 在小蠹虫危害寄主甚至导致寄主死亡的过程中起到了重要作用。一些长喙壳类真菌是重要的植物病原物, 具有强致病力。实现病原菌的特异性和快速检测是明确病害分布和评估其危害的前提条件。为克服传统组织分离受多种因素制约的缺陷, 对2种病原菌进行快速特异性聚合酶链式反应(PCR)检测, 以内源转录间隔区(ITS)为目标序列, 对比 *Endoconidiophora* 属和 *Ophiostoma* 属的14个近缘种, 分别筛选出可以从目标真菌类群以及寄主组织中扩增出特异性片段的种特异性(SS-)PCR引物对 OK1/OK2 和 CFU1/CFU2。引物对 OK1/OK2 可以从 *O. olgensis* 中特异性扩增出1条248 bp的清晰明亮条带, 引物对 CFU1/CFU2 可以从 *E. fujensis* 中特异性扩增出1条251 bp的清晰明亮条带。使用特异性引物能够直接从感病韧皮部组织中检测出 *O. olgensis* 和 *E. fujensis*。图3表1参33

关键词: 森林保护学; 落叶松八齿小蠹; *Ophiostoma olgensis*; *Endoconidiophora fujensis*; SS-PCR 快速检测

中图分类号: S763.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2018)01-0128-07

Specific and rapid detection of the pathogenic fungi associated with *Ips subelongatus*

LIU Xuewei^{1,2,3}, WANG Zheng^{1,2}, LÜ Quan^{1,2}, ZHANG Xueping⁴, WANG Xiuqin⁵,
KONG Xiangbo², ZHANG Xingyao^{1,2}

(1. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. Key Laboratory of Forestry Protection of State Forestry Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 3. Forest Enterprise of Wuqing District, Tianjin 301700, China; 4. Hailar National Forest Park, Hailar 021000, Inner Mongolia, China; 5. Department of Biochemical Engineering, Chaoyang Teachers College, Chaoyang 122000, Liaoning, China)

Abstract: *Ips subelongatus*, a native bark beetle categorized as a dangerous forest pest in China having caused huge losses to larch forests, and ophiostomatoid fungi, important plant pathogens with strong pathogenicity which numerous studies have shown to be the main group of fungi associated with bark beetles, have played a key role in the process of beetle damage, sometimes killing tree hosts. This study on specific and rapid detection of pathogens, a prerequisite for clarifying the distribution of diseases and assessing their hazards, was designed to overcome the shortcomings of traditional tissue isolation, which normally influenced by a variety of anthropological factors. Two pathogens *Ophiostoma olgensis* and *Endoconidiophora fujensis* were specifically detected by polymerase chain reaction (PCR). Internal transcribed spacer (ITS) sequences were used as a tar-

收稿日期: 2016-12-19; 修回日期: 2017-02-16

基金项目: 国家林业局林业公益性行业科研专项(201404401); 国家自然科学基金资助项目(31070571)

作者简介: 刘学伟, 从事森林病原学研究。E-mail: babyliuxuewei@163.com。通信作者: 吕全, 研究员, 博士, 从事森林病理学研究。E-mail: luquan@caf.ac.cn

get to design species specific (SS-) PCR primers through comparison of 14 sibling species from the genera *Endoconidiophora* and *Ophiostoma*. Results showed that two pairs of primers (OK1/OK2 and CFU1/CFU2), which could amplify specific sequences from the fungal flora and host tissues, were screened out. Primer pairs OK1/OK2 and CFU1/CFU2 specifically amplified a clear and bright band of 248 bp from *O. olgensis* and 251 bp from *E. fujensis*. Thus, *O. olgensis* and *E. fujensis* were detected by the SS-PCR from phloem tissues in which the two fungi had been previously isolated. [Ch, 3 fig. 1 tab. 33 ref.]

Key words: forest protection; *Ips subelongatus*; *Ophiostoma olgensis*; *Endoconidiophora fujensis*; SS-PCR rapid detection

落叶松八齿小蠹 *Ips subelongatus* 给东北以落叶松 *Larix* spp. 为建群树种的森林生态系统带来了巨大的经济和生态损失^[1-2], 被列为中国林业危险性有害生物。在森林生态系统中, 小蠹虫与真菌能够形成稳定的伴生关系, 这种关系某种程度上属于互惠共生。长喙壳类真菌(ophiostomatoid fungi)为小蠹虫伴生真菌的主要类群^[3-5]。许多情况下小蠹虫危害寄主甚至导致寄主死亡的过程中, 长喙壳类真菌起到关键作用^[6-7]。一些长喙壳类真菌是重要的林木病原物, 具有强致病力。如 *Endoconidiophora polonica* 在人工接种条件下可以将 40 年生云杉 *Picea abies* 致死^[8], 而且伴生菌的侵染还可以增加小蠹的危害性^[9]。近年来, 中国也对落叶松八齿小蠹伴生真菌有一些研究和报道^[10-12], 主要集中在对伴生菌的鉴定和系统发育分析上^[13-14], 发现了多种落叶松八齿小蠹伴生长喙壳真菌种类。野外落叶松成熟林接种实验表明: *Ophiostoma olgensis* 和 *Endoconidiophora fujensis* 等 2 个优势种表现出显著的致病性, 这 2 种真菌可以在内韧皮部和形成层形成明显坏死斑^[10,15]。由于该类病害发生隐蔽, 一般很难早期发现和诊治。为了达到早发现早治疗的目的, 摸清病害的分布并评估其危害, 需要实现对病原菌的快速和准确检测, 从而为病害和虫害的防治提供科学基础。快速检测技术已经广泛应用于植物病原物和害虫的检测, 如线虫、病原真菌、枣实蝇 *Carpomya vesuviana* 和细菌等^[16-21]。针对不同物种检测所用方法也不同, 特异引物聚合酶链式反应(PCR)检测方法是设计特异性引物来实现对待检目标的特异性检测, 国外已有一些长喙壳真菌种类利用该方法实现检测的报道^[19-21], 但对中国北方落叶松林内分布的病原菌的快速检测一直是空白。传统组织分离法是进行病害鉴定的首要方法, 然而受人为和环境因素, 以及病原菌的生长特点等影响, 往往不能对病原菌实现有效分离。尝试直接从感病寄主组织中提取 DNA 进行病原菌的特异性检测, 是本研究希望解决的问题。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试验菌株 试验菌株为分离自中国北方的兴安落叶松 *Larix gmellini*, 长白落叶松 *L. olgensis*, 华北落叶松 *L. principis-rupprechtii* 和日本落叶松 *L. kaempferi* 林中的落叶松八齿小蠹伴生真菌, 包括 *Endoconidiophora fujensis* 等, 分布于欧洲落叶松 *L. decidua* 林内的近缘种欧洲落叶松八齿小蠹 *Ips cembrae* 和欧洲云杉 *Picea abies* 林内的近缘种云杉八齿小蠹 *Ips typographus* 伴生的长喙壳真菌种类, 包括 *Endoconidiophora laricicola* 等, 以及其他长喙壳真菌近缘种, 如分离自山东、浙江的松材线虫病 *Bursaphelenchus xylophilus* 伴生长喙壳真菌, 菌株详细信息见表 1。除分离自中国的长喙壳类真菌外, 其余菌株购自荷兰乌得勒支菌种保藏中心(CBS), 或交流自南非林业和农业生物技术菌种保藏中心(CMW), 加拿大国家真菌标本和菌种保藏中心(DAOM)和日本筑波大学植物病理与真菌学、生命与环境科学实验室(YCC)。上述菌株保存在中国林业科学研究院菌物保存中心(CFCC)与森林生态环境与保护研究所森林病理实验室(CXY)。

1.1.2 主要仪器与试剂 PCR 仪(Biometra, 德国), Mixer/Mill 8000 高能量球磨机(SPEX CertiPrep, 美国), DYY-4 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂, 中国), Alpha imager EP 凝胶成像系统(ProteinSimple, 美国), 天根植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型), 核酸染料。

1.2 实验方法

1.2.1 样本的采集 在北方 3 种落叶松林内进行落叶松八齿小蠹虫体样本与坑道组织样本的采集, 每个

表 1 特异性引物设计与检测所用长喙壳真菌菌株信息

Table 1 *Ophiostoma* and *Endoconidiophora* species used for developing species-specific sequences primers

种名	菌株编号	寄主植物/伴生昆虫	采集地	ITS 序列登录号
<i>Endoconidiophora fujiei</i>	CBS100208*	日本落叶松/落叶松八齿小蠹	日本	AY233948
	CMW1952	日本落叶松/落叶松八齿小蠹	日本	AY233924
	CXY1506*	兴安落叶松/落叶松八齿小蠹	中国内蒙古	KC762578
	CXY1515*	华北落叶松/落叶松八齿小蠹	中国内蒙古	KC762574
	CXY1520*	长白落叶松/落叶松八齿小蠹	中国黑龙江	KC762582
<i>E. laricicola</i>	CBS100207*	欧洲落叶松/欧洲落叶松八齿小蠹	苏格兰	AY233910
	CBS109260*	欧洲落叶松/欧洲落叶松八齿小蠹	奥地利	AY233918
	CMW4522	欧洲落叶松/欧洲落叶松八齿小蠹	苏格兰	AY233908
<i>E. polonica</i>	CBS133.38*	欧洲云杉/云杉八齿小蠹	波兰	AY233898
	CBS109263*	欧洲云杉/云杉八齿小蠹	奥地利	AY233904
	CMW2284	日本鱼鳞云杉 <i>Picea jezoensis</i> /云杉八齿小蠹	日本	AY233894
<i>Ophiostoma abietinum</i>	CBS125.89	冷杉 <i>Abies fabri</i> /平海小蠹 <i>Pseudohylesinus swain</i>	墨西哥	AF484453
	CXY1555*	长白落叶松/落叶松八齿小蠹	中国黑龙江	KY593322
<i>O. bicolor</i>	CBS492.77*	白云杉 <i>Picea glauca</i> /白云杉齿小蠹 <i>Ips perturbatts</i>	美国	DQ268604
<i>O. cf. bicolor</i>	CXY1524*	华北落叶松/落叶松八齿小蠹	中国内蒙古	KY593321
<i>O. brunneo-ciliatum</i>	CXY1416*	兴安落叶松/落叶松八齿小蠹	中国内蒙古	KY593323
	CMW5214	落叶松 <i>Larix</i> sp.	苏格兰	HM031501
<i>O. deltoideosporum</i>	CXY1624*	黑松 <i>Pinus thunbergii</i> /松材线虫病	中国山东	KY094069
<i>O. floccosum</i>	CMW12622	欧洲赤松 <i>Pinus sylvestris</i>	奥地利	FJ430472
	CXY1412*	兴安落叶松/落叶松八齿小蠹	中国内蒙古	KY593320
<i>O. ips</i>	CMW9005	欧洲赤松/松六齿小蠹 <i>Ips acuminatus</i>	瑞典	AY546698
	CXY1628*	黑松/松材线虫病	中国山东	KY593324
<i>O. kryptum</i>	DAOM 229705*	欧洲落叶松/欧洲落叶松八齿小蠹	奥地利	AY304426
<i>O. minus</i>	CMW26254	红脂大小蠹 <i>Dendroctonus valens</i>	中国	EU785442
	YCC658	日本落叶松/落叶松八齿小蠹	日本	GU134172
<i>O. novo-ulmi</i>	CMW1461	英国榆 <i>Ulmus procera</i>	美国	FJ430476
<i>O. olgensis</i>	CXY1406*	兴安落叶松/落叶松八齿小蠹	中国内蒙古	KU551301
	CXY1411*	长白落叶松/落叶松八齿小蠹	中国黑龙江	KU551304
<i>O. cf. olgensis</i>	CXY1642*	马尾松/松材线虫病	中国浙江	KY094074
<i>O. piceae</i>	CMW 3099	云杉 <i>Picea</i> sp.	加拿大	FJ430484

说明：* 表示特异 PCR 检测所用菌株。

虫体单独保存于灭菌 1.5 mL 的离心管内，坑道标本分装于干净牛皮纸信封内，自然通风保存。尽快带回实验室用于真菌的分离和 DNA 的提取。

1.2.2 真菌分离及鉴定 伴生真菌的分离采用组织分离法，用剪刀将坑道标本切成 5 mm × 5 mm 大小的组织块，用质量分数为 1.5%次氯酸钠溶液进行表面消毒处理 50 s，后用无菌水冲洗干净。将冲洗干净的组织块放在无菌滤纸上，待表面水分吸干后接种质量分数为 2%的水琼脂培养基上，将培养皿封口后置于 25 ℃恒温培养箱黑暗培养。培养 4 d 后挑取菌落外端的菌丝块进行分离纯化，将纯化后的真菌接种到质量分数为 2% MEA 培养基(麦芽浸粉 10 g，琼脂粉 10 g，加蒸馏水配制 500 mL)进行培养。基于形态学和 DNA 片段系统发育分析鉴定为 *Ophiostoma olgensis* 和 *Eudoconidiophora fujiei*^[14-15]。

1.2.3 DNA 提取 从菌丝块和韧皮坑道组织样本中提取 DNA。菌丝块 DNA 提取：首先用无菌接种针挑取收集菌丝组织，将菌丝块放入 1.5 mL 的离心管中，放在-20 ℃冰箱中冷冻，采用北京天根公司植物基因组 DNA 提取试剂盒推荐的方法来提取 DNA。在分别分离到病原菌 *O. olgensis* 和 *E. fujiei* 的感病韧皮部组织样本中提取总 DNA，方法如下：将样本切成 4 mm × 4 mm 大小的组织块，放入 1.5 mL 的离心管中，放在-20 ℃冰箱中冷冻 1 晚，然后将其放在高能球磨机中研磨 7 min，余下步骤与菌丝组织 DNA 提取方法相同。

1.2.4 引物设计及 PCR 扩增条件 分别以 *Ophiostoma olgensis* 和 *Eudoconidiophora fujiensis* 的 ITS 序列为目标序列^[22-23], 通过 Blast 在基因库(GenBank)上搜索与之亲缘关系较近的菌种已发表的 ITS 序列(表 1), 用 MAFFT 在线进行序列比对分析。针对目标菌种的特殊序列区域人工设计引物, 之后针对引物是否存在发夹结构和二聚体等使用 Primer Premier 5.0 进行检查。将设计好的引物序列在 GenBank 中检查序列同源性。针对 *O. olgensis* 设计引物 15 对, 针对 *E. fujiensis* 设计引物 10 对, 并分别对目标菌种纯培养物 DNA 进行扩增反应, 用琼脂糖凝胶进行电泳检测, 通过观察扩增条带的宽度和大小进行筛选, 各获得特异引物 1 对, 用于上述菌丝和寄主组织 DNA 的扩增。引物由北京宝锐通生物科技有限公司合成。PCR 扩增反应体系如下: 100 mmol·L⁻¹ 氯化钾, 2×Taq PCR MasterMix [500 μmol·L⁻¹ 三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTP), 0.1 U(1 U=16.67 nkat)Taq 聚合酶, 3 mmol·L⁻¹ 氯化镁, 20 mmol·L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl, pH 8.3)]12.5 μL, 双蒸水 9.5 μL, 模板 1.0 μL, 引物(浓度 1 μmol·L⁻¹)各 1.0 μL。针对 *O. olgensis* 和 *O. kryptum* 的反应条件为 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 1 min, 63 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 循环 35 次; 72 ℃ 4 min。针对 *E. fujiensis* 的反应条件为 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 1min, 64 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 循环 35 次; 72 ℃ 4 min。PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶(2.2%)进行电泳检测(130 V, 60 min), 拍摄电泳照片, 观察扩增条带的宽度和大小。

2 结果与分析

2.1 引物特异性检测

筛选获得针对 *O. olgensis* 特异性检测的引物 1 对: OK1(5'-CTCGAACCTTTTTTTTAAACCGT-3')和 OK2(5'-GCCAGCGCACCCAGAA-GGTTGCGC-3')。对 *O. olgensis* 和从落叶松八齿小蠹上分离到的 *Ophiostoma* 属真菌及与之亲缘关系较近的其他长喙壳类真菌一起进行 PCR 扩增, 对扩增后的产物进行琼脂糖凝胶电泳分离, 结果表明除了 *O. olgensis* 和 *O. kryptum* 的菌株在 248 bp 处有一条清晰明亮的条带外, 其他菌株均无任何条带(图 1)。

筛选获得针对 *E. fujiensis* 特异性检测的引物 1 对: EFU1(5'-CTAGAGAATTTATTTTCATTGCTGA-3')和 EFU2(5'-GCAAAGATATGC-GGGTCCT-3')。对 *E. fujiensis* 和从落叶松八齿小蠹上分离到的 *Ophiostoma* 属真菌及与之亲缘关系较近的其他 *Endoconidiophora* 属真菌一起进行 PCR 扩增, 对扩增后的产物进行琼脂糖凝胶电泳分离。除了 *E. fujiensis* 的菌株在 251 bp 处有 1 条清晰明亮的条带外, 其他菌株均无任何条带(图 2)。

2.2 感病韧皮部组织样本病原物特异性检测

提取感染 *O. olgensis* 真菌的韧皮部组织样本 DNA, 以 *O. olgensis* 和 *O. kryptum* 纯培养物 DNA 为对照, 用特异性引物 OK1/OK2 进行 PCR 扩增, 对扩增后的产物进行琼脂糖凝胶电泳, 均检测到 1 条 248 bp 大小的条带(图 3A)。但韧皮部组织 DNA 的 PCR 产物条带与 *O. olgensis* 和 *O. kryptum* 纯培养物 DNA 的 PCR 扩增产物相比, 条带不够清晰。为了获取清晰条带, 以本次感病组织 PCR 扩增产物为模板, 进行第 2 次 PCR 反应, 反应条件为 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 1 min, 68 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 循环 35 次; 72 ℃ 4 min。经琼脂糖凝胶电泳检测到与纯培养物扩增产物一样清晰的 248 bp 大小的条带(图 3B)。

提取感染 *E. fujiensis* 真菌的韧皮部组织样本 DNA, 以 *E. fujiensis* 纯培养物 DNA 模板为对照, 用特异性引物 EFU1/

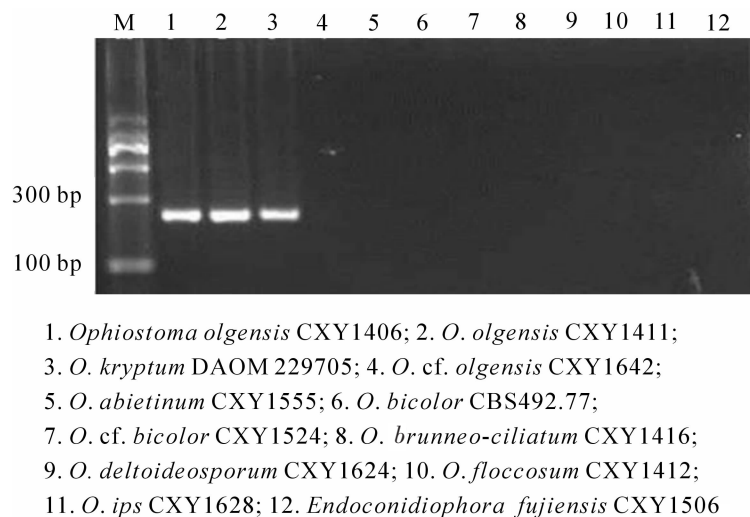


图 1 特异性引物检测 *Ophiostoma olgensis* 和其他长喙壳真菌纯培养物的凝胶图谱

Figure 1 Agarose gel images of PCR amplicons obtained with the specific primers of *Ophiostoma olgensis*

EFU2 进行 PCR 扩增, 对扩增后的产物进行琼脂糖凝胶电泳分离。韧皮部组织样本 DNA 的 PCR 产物与 *E. fujensis* 纯培养物 DNA 的 PCR 产物在 251 bp 处都有 1 条较清晰的条带(图 3C)。

3 结论与讨论

本研究针对落叶松八齿小蠹在中国的优势伴生病原菌 *O. olgensis* 和 *E. fujensis*, 分别筛选出 2 对检测引物 OK1/OK2 和 EFU1/EFU2, 能够实现从伴生菌区系和其他长喙壳类真菌近缘种中特异性检测到这 2 个种, 并且得以从感病寄主组织中对病原菌进行直接检测, 为实现这 2 种病原菌的检疫和早期监测提供了条件。

O. olgensis 是中国最近发现的一个新种^[15], 与 *O. kryptum* 的亲缘关系十分接近, 这 2 个近缘种的 ITS 一级结构差异仅在序列两翼。为了能够与其他更广泛的长喙壳类真菌区分, 本研究筛选出的特异性 PCR 引物(OK1/OK2)是选取 ITS 序列中间区段设计出来的, 因此无法区分这 2 个种。*O. kryptum* 是欧洲落叶松八齿小蠹伴生的病原菌种类^[24], 目前未发现在中国分布。因此, 该引物可以在中国落叶松林内实现对 *O. olgensis* 的特异性检测。但由于欧亚大陆的一体性以及落叶松林的广泛分布, *O. kryptum* 有传入中国的潜在威胁, 因此下一步工作仍需针对区分这 2 个近似种进行特异性引物设计和检测。对包括日本在内 4 个地区不同寄主的 *E. fujensis* 菌株进行了检测, 均可得到特异性扩增, 表明此方法对 *E. fujensis* 的检测具有普遍适用性。*E. fujensis* 是落叶松八齿小蠹伴生菌区系中的先锋种和致病力最强的病原菌^[14], 对它实现特异性快速检测将为制定防治病虫复合危害的有效策略和措施提供科学依据。

近几年, 越来越多的分子生物学快速检测技术被运用到病原物和害虫的检疫检测当中, 如特异性 PCR 方法, 免疫层析法, 环介导等温扩增(LAMP)技术检测法等^[25-29]。特异性 PCR 检测方法相对于传统形态学检测方法优势明显: 采用特定序列扩增聚合酶链式反应(SCAR-PCR)的方法研制松材线虫快速检

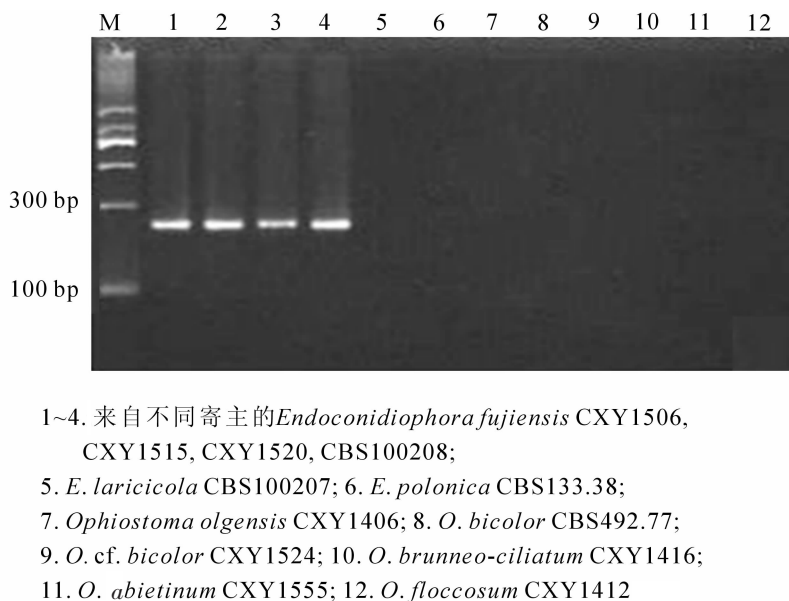
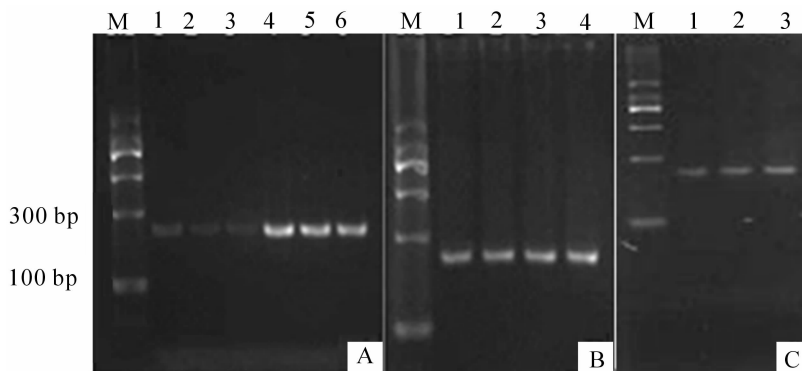


图 2 特异性引物检测 *Endoconidiophora fujensis* 和其他长喙壳真菌纯培养物的凝胶图谱

Figure 2 Agarose gel images of PCR amplicons obtained with specific primers of *Endoconidiophora fujensis*



A: 1~3. 感病韧皮部组织样本; 4. *Ophiostoma olgensis* CX1406;
5. *O. olgensis* CX1411; 6. *O. kryptum* DAOM 229705
B: 1~2. 感病韧皮部组织样本; 3. *O. olgensis* CX1411;
4. *O. kryptum* DAOM 229705
C: 1~2. 感病韧皮部组织样本; 3. *Endoconidiophora fujensis* CX1506

Figure 3 Agarose gel images of PCR amplicons obtained with specific primers for *Ophiostoma olgensis*, *O. kryptum* and *Endoconidiophora fujensis* from infectious phloem tissues

测试剂盒, 对松材线虫的检测准确率达 100%, 弥补了形态学鉴定的不足^[16]; 利用枣实蝇 mtDNA 的 COI 基因片段设计并筛选出的特异性引物的 SS-PCR 方法, 实现了对不同虫态枣实蝇的特异性快速检测^[17]; 简单重复序列-聚合酶链式反应(SS-PCR)技术也能够提升美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* 的鉴定与检测效率和准确性^[18]。目前国外对约 7 种长喙壳类伴生菌开展了基于 PCR 的特异性检测^[21,30-33]。鉴于长喙壳类真菌的致病性及其与昆虫复合危害寄主的特殊性, 有必要进一步开展国内其他重要长喙壳类病原真菌的检测研究。本研究仅对感病寄主组织开展了病原菌的检测, 下一步仍需对虫体带菌、人工接种等方式优化检测反应体系和定量评估检测的灵敏度。

4 参考文献

- [1] 殷惠芬, 黄复生. 中国经济昆虫志[M]. 北京: 科学技术出版社, 1984: 54 – 55.
- [2] 萧刚柔. 中国森林昆虫[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992.
- [3] UPADHYAY H P. A *Monograph of Ceratocystis and Ceratocystiopsis* [M]. Athens: University of Georgia Press, 1981.
- [4] JACOBS K, WINGFIELD M J, COETSEE C, et al. *Leptographium guttulatum* sp. nov., a new species from spruce and pine in Europe [J]. *Mycologia*, 2001, **93**(2): 380 – 388.
- [5] ZIPFEL R D, de BEER Z W, JACOBS K, et al. Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma* [J]. *Stud Mycol*, 2006, **55**(55): 75 – 97.
- [6] PAINE T D, RAFFA K F, HARRINGTON T C. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers [J]. *Ann Rev Entomol*, 1997, **42**(1): 179 – 206.
- [7] KIRISITS T. Fungal Associates of European bark beetles with special emphasis on the *Ophiostomatoid* fungi [G]// LIEUTIER F, DAY K R, BATTISTI A, et al. *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis*. Dordrecht: Springer, 2007: 181 – 236.
- [8] CHRISTIANSEN E. *Ceratocystis polonica* inoculated in Norway spruce: blue-staining in relation to inoculum density, resinosis and tree growth [J]. *For Pathol*, 1985, **15**(3): 160 – 167.
- [9] KIRISITS T. Fungi isolated from *Picea abies* infested by the bark beetle *Ips typographus* in the Białowieża forest in north-eastern Poland [J]. *For Pathol*, 2010, **40**(2): 100 – 110.
- [10] 周秀华, 崔磊, 邓勋, 等. 落叶松八齿小蠹伴生真菌富士长喙壳的致病性研究[J]. 河南农业科学, 2011, **40**(12): 102 – 105.
ZHOU Xiuhua, CUI Lei, DENG Xun, et al. Pathogenicity of *Ceratocystis fujensis* strains associated with *Ips sublongatus* [J]. *J Henan Agric Sci*, 2011, **40**(12): 102 – 105.
- [11] 周秀华, 宋瑞清, 周旭东, 等. 落叶松八齿小蠹体内外和坑道内真菌类群[J]. 菌物学报, 2011, **30**(3): 400 – 407.
ZHOU Xiuhua, SONG Ruiqing, ZHOU Xudong, et al. Fungal population in the inside and outside of *Ips subelongatus* body and the gallery of insect-bored larch logs [J]. *Mycosystema*, 2011, **30**(3): 400 – 407.
- [12] 孟贤静. 中国落叶松八齿小蠹伴生的长喙壳真菌鉴定及其系统发育[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013.
MENG Xianjing. *Identification and Phylogeny of Ophiostomatoid Fungi Associated with Ips subelongatus in China* [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2013.
- [13] 刘学伟, 吕全, 孟贤静, 等. 我国落叶松八齿小蠹伴生粘束孢属(*Graphium*)真菌的鉴定及其系统发育分析[J]. 林业科学, 2016, **52**(8): 76 – 87.
LIU Xuwei, LÜ Quan, MENG Xianjing, et al. Identification and phylogeny of *Graphium* spp. (Microascales: Graphiaceae) associated with *Ips subelongatus* (Coleoptera: Scolytidae) in China [J]. *Sci Silv Sin*, 2016, **52**(8): 76 – 87.
- [14] 孟贤静, 吕全, 刘学伟, 等. 落叶松八齿小蠹与长喙壳真菌间的种特异性伴生关系[J]. 生态学报, 2015, **35**(2): 313 – 323.
MENG Xianjing, LÜ Quan, LIU Xuwei, et al. The species specific associations between *Ips subelongatus* and ophiostomatoid fungi [J]. *Acta Ecol Sin*, 2015, **35**(2): 313 – 323.
- [15] WANG Huimin, LU Quan, MENG Xianjing, et al. *Ophiostoma olgensis*, a new species associated with *Larix* spp. and *Ips subelongatus* in Northern China [J]. *Phytotaxa*, 2016, **282**(4): 282 – 290.
- [16] 陈凤毛, 叶建仁, 吴小芹, 等. 松材线虫快速检测试剂盒研制[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2007, **31**(4): 133 – 135.

- CHEN Fengmao, YE Jianren, WU Xiaoqin, *et al.* Development of quick detection kit for *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2007, **31**(4): 133 – 135.
- [17] 程晓甜, 阿地力·沙塔尔, 张伟, 等. 枣实蝇特异引物 PCR 鉴定技术[J]. 林业科学, 2013, **49**(11): 98 – 102.
CHENG Xiaotian, Adili Shataer, ZHANG Wei, *et al.* Species-specific PCR primers for identification of *Carpomyia vesuviana* [J]. *Sci Silv Sin*, 2013, **49**(11): 98 – 102.
- [18] 张桂芬, 刘万学, 郭建英, 等. 美洲斑潜蝇 SS-PCR 检测技术研究[J]. 生物安全学报, 2012, **21**(1): 74 – 78.
ZHANG Guifen, LIU Wanxue, GUO Jianying, *et al.* Species-specific PCR primers for identification of *Liriomyza sativae* Blanchard [J]. *J Biosaf*, 2012, **21**(1): 74 – 78.
- [19] KIM S H, UZUNOVIC A, BREUIL C. Rapid detection of *Ophiostoma piceae* and *O. quercus* in stained wood by PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(1): 287 – 290.
- [20] ROETS F, WINGFIELD M J, DREYER L L, *et al.* A PCR-based method to detect species of *Gondwanamyces* and *Ophiostoma* from the surfaces of insects colonizing Protea flowers [J]. *Can J Bot*, 2006, **84**(6): 989 – 994.
- [21] SCHWEIGKOFER W, OROSINA W J, SMITH S L, *et al.* Detection and quantification of *Leptographium wageneri*, the cause of black-stain root disease, from bark beetles (Coleoptera: Scolytidae) in Northern California using regular and real-time PCR [J]. *Can J For Res*, 2005, **35**(8): 1798 – 808.
- [22] SUMMERBELL R C, LÉVESQUE C A, SEIFERT K A, *et al.* Microcoding: the second step in DNA barcoding [J]. *Philos Trans Royal Soc B Biol Sci*, 2005, **360**(1462): 1897 – 1903.
- [23] DETTMAN J R, JACOBSON D J, TAYLOR J W. Multilocus sequence data reveal extensive phylogenetic species diversity within the *Neurospora discreta* complex [J]. *Mycologia*, 2006, **98**(3): 436 – 446.
- [24] JACOBS K, KIRISITS T. *Ophiostoma kryptum* sp. nov. from *Larix decidua* and *Picea abies* in Europe, similar to *O. minus* [J]. *Mycolo Res*, 2003, **107**(10): 1231 – 1242.
- [25] BALAJEE S A, HOUBRAKEN J, VERWEIJ P E, *et al.* *Aspergillus* species identification in the clinical setting [J]. *Stud Mycol*, 2007, **59**: 39 – 46.
- [26] NILSSON R H, KRISTIANSSON E, RYBERG M, *et al.* Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification [J]. *Evol Bioinf Online*, 2008, **4**: 193 – 201.
- [27] PETIT R J, EXCOFFIER L. Gene flow and species delimitation [J]. *Trends Ecol Evol*, 2009, **24**(7): 386 – 393.
- [28] ROE A D, RICE A V, BROMILOW S E, *et al.* Multilocus species identification and fungal DNA barcoding: insights from blue stain fungal symbionts of the mountain pine beetle [J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, **10**(6): 946 – 959.
- [29] LEE S, KIM J J, FUNG S, *et al.* A PCR-RFLP marker distinguishing *Ophiostoma clavigerum* from morphologically similar *Leptographium* species associated with bark beetles [J]. *Can J Bot*, 2003, **81**(11): 1104 – 1112.
- [30] OH S, KAMDEM D P, KEATHLEY D E, *et al.* Detection and species identification of wood-decaying fungi by hybridization of immobilized sequence-specific oligonucleotide probes with PCR-amplified fungal ribosomal DNA internal transcribed spacers [J]. *Holzforschung*, 2003, **57**(4): 346 – 352.
- [31] LOPPNAU P A, BREUIL C. Species level identification of conifer associated *Ceratocystis sapstain* fungi by PCR-RFLP on a β -tubulin gene fragment [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **222**(1): 143 – 147.
- [32] SCHROEDER S, KIM S H, LEE S, *et al.* The β -tubulin gene is a useful target for PCR-based detection of an albino *Ophiostoma piliferum* used in biological control of sapstain[J]. *Eur J Plant Pathol*, 2002, **108**(8): 793 – 801.
- [33] YUN Y H, SUH D Y, SON S Y, *et al.* Development of PCR method for fast detection of *Ophiostoma floccosum* in wood chips [J]. *Afri J Microbiol Res*, 2013, **7**(19): 1913 – 1916.