

DOI: 10.5846/stxb201304010576

孟贤静, 吕全, 刘学伟, 焦相杰, 梁军, 张星耀. 落叶松八齿小蠹与长喙壳真菌间的种特异性伴生关系. 生态学报, 2015, 35(2): 313-323.

Meng X J, Lü Q, Liu X W, Jiao X J, Liang J, Zhang X Y. The species specific associations between *Ips subelongatus* and ophiostomatoid fungi. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(2): 313-323.

落叶松八齿小蠹与长喙壳真菌间的种特异性伴生关系

孟贤静¹, 吕全^{1,*}, 刘学伟¹, 焦相杰², 梁军¹, 张星耀¹

¹ 国家林业局森林保护学重点实验室, 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091

² 内蒙古赤峰市克什克腾旗广兴林场, 赤峰 025350

摘要: 小蠹虫与长喙壳类真菌 (Ophiostomatoid fungi) 在自然界中形成稳定的伴生关系, 是森林生态系统内一种普遍的生态学现象。已有研究表明欧亚大陆的齿小蠹属 (*Ips*) 昆虫与多种长喙壳类真菌形成广泛的伴生关系, 其中部分真菌是重要的针叶树病原菌。随着借助于 DNA 信息特征的系统发育分析, 揭示出形态特征和亲缘关系十分接近的 3 种齿小蠹属昆虫, 云杉八齿小蠹 (*I. typographus*), 欧洲落叶松八齿小蠹 (*I. cembrae*) 和亚洲落叶松八齿小蠹 (*I. subelongatus*) 确定为不同种之后, 相应地与之稳定伴生的长喙壳类真菌 *Ceratocystis polonica* 也由过去一个种揭示为 3 个种的复合体, 各自与 3 种小蠹虫稳定伴生, 形成密切的种特异性伴生关系。小蠹虫与真菌的种特异性伴生被认为是处于同一森林生态系统内的生物协同进化的结果。通过对我国东北地区落叶松八齿小蠹虫体、坑道标本上伴生真菌菌株的采集、分离和生理学、形态学特征观察, 以及基于 ITS、 β -tubulin、MAT-2 HMG box 多位点 DNA 序列的系统发育分析, 首次确定了长喙壳真菌 *Ceratocystis fujensis* 在我国东北地区异域分布的 3 种落叶松林内普遍存在, 与落叶松八齿小蠹形成稳定的伴生关系。作为亚洲落叶松八齿小蠹伴生的主要真菌, 也是伴生菌区系中的先锋种和致病力最强的病原菌, *C. fujensis* 在我国落叶松人工林的广泛分布值得高度重视, 将为制定防治病虫害复合危害的有效策略和措施提供科学基础。研究结果进一步支持了齿小蠹属昆虫与长喙壳真菌间的种特异性伴生假说。同时, 多基因序列特征表明落叶松八齿小蠹与 *C. fujensis* 在亚洲范围内的不同地理种群存在着显著的遗传多样性, 预示特异性伴生在不同种群间发生的可能, 可以为种特异性伴生假说和小蠹虫-真菌间共生关系的研究提供良好的模式材料。

关键词: 亚洲落叶松八齿小蠹; *Ceratocystis fujensis*; 系统发育; 落叶松; 病原菌

The species specific associations between *Ips subelongatus* and ophiostomatoid fungi

MENG Xianjing¹, LÜ Quan^{1,*}, LIU Xuewei¹, JIAO Xiangjie², LIANG Jun¹, ZHANG Xingyao¹

¹ Key Laboratory of Forestry Protection, State Forestry Administration; Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

² Guangxing Forestry Farm, KeShiKeTengqi, Chifeng City in Inner Mongolia, Chifeng 025350, China

Abstract: The bark-beetles and ophiostomatoid fungi formed a stable association relationship in nature. It is a universal ecology phenomenon occurring frequently in forest ecological systems. The association between the beetles and fungi are regarded to some extent as a symbiosis in a broad sense. They have been extensively and intensively documented and illustrated from all over the world since it was first realized. Some research showed that *Ips* beetles spread over Eurasia were extensively associated with a number of ophiostomatoid fungi species. Among which, some species are important pathogens of conifers. Although the morphology and ecology characteristics of three *Ips* beetles, *I. typographus*, *I. cembrae*, and *I. subelongatus* were almost identical, these beetles were evidenced in a series studies as distinct species based on the

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (CAFRIFEEP201102); 国家自然科学基金 (31070571)

收稿日期: 2013-04-01; **网络出版日期:** 2014-07-03

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: luquan@caf.ac.cn

phylogenetic analysis of DNA information and critical morphological comparison. In parallel, an ophiostomatoid fungus, *Ceratocystis polonica* previously recognized as a closely associated fungus with these beetles was also separated into three distinct entities resided in the *Ceratocystis coerulescens* species complex, and stably associated with three kinds of bark beetles, respectively, where a species specific association between bark beetles and ophiostomatoid fungi was established. The species specific association was understood as a result of co-evolution in forests where both partners lived together in a common habitat. The samples collected in this study from three allopatric *Larix* hosts which *Ips subelongatus* attacked seriously. The ophiostomatoid strains were isolated from the body surface of *Ips subelongatus*, blue-stain tissue or the galleries bark-beetles attacked. Observations of the colony, physiology and morphology characteristic, and comparisons of anamorph and teleomorph structures of all *Ceratocystis* strains, confirmed that the strains are indistinguishable from *Ceratocystis fujensis* M.J.Wingf. The phylogenetic analysis based on sequences derived from the ITS regions of the rDNA operon, the partial β -tubulin gene and the MAT-2 HMG box gene, further determined a total of nineteen fungal strains as species *Ceratocystis fujensis*. The study first determined *Ceratocystis fujensis* extensively existed in three allopatric larch forests in northeast and north China, which formed a stable association relationship with *Ips subelongatus* under such ecological conditions. *Ceratocystis fujensis* was proved as a dominant fungus associated with *Ips subelongatus* in Japan, and a pioneer species and the strongest pathogenic fungus in all the bark-beetles associated fungi. Because *C. fujensis* widely infesting *Larix* spp. plants in China, inevitably, this phenomenon should be paid high attention. The study provides scientific basis to make the policies and measures for the government to prevent and control the composite damages of diseases and pests effectively. The result in this paper provides support to the hypothesis of species specific association between *Ips* beetles and ophiostomatoid fungi. Meanwhile, the multi-gene sequences characteristic indicates that *I. subelongatus* and *C. fujensis* exist significant genetic diversity in different geographic populations, which probably predict the possibility of the species specific association occurred under species levels. The associations between *Ips* beetles and ophiostomatoid fungi exhibit an ideal insight into completely understanding the symbiotic relationship between the bark beetles and ophiostomatoid fungi, and species specific association as well.

Key Words: *Ips subelongatus*; *Ceratocystis fujensis*; phylogeny; *Larix* spp.; pathogen

落叶松属植物(*Larix* spp.)作为落叶松八齿小蠹(*Ips subelongatus*)的主要寄主,是速生丰产用材林基地建设的首选树种,在我国广泛分布。然而,落叶松纯林的大量营造为落叶松的广泛分布和大量纯林为落叶松八齿小蠹的发生和传播蔓延提供了条件。目前发现,落叶松八齿小蠹在我国的地理分布范围极广^[1],主要危害东北和华北异域分布的兴安落叶松(*L. gmelini*)、长白落叶松(*L. olgensis*)和华北落叶松(*L. principis-rupprechtii*)^[2]。

落叶松八齿小蠹作为次期性害虫的先锋种,主要侵害伐倒木、濒死木,发生盛期也可危害健康或衰弱的活立木,给我国的落叶松人工林造成巨大的损失和威胁^[3,4],被列入“全国林业危险性有害生物名单”(国家林业局 2013 年第 4 号公告)^[5],同时也是欧洲和地中海植物保护组织(EPPPO)预警名单 A2(<http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm>)里的种类。

小蠹虫和真菌之间的伴生是森林生态系统内一种普遍的生态学现象,是生物长期协同进化的结果。伴生真菌,尤其是长喙壳类真菌(ophiostomatoid fungi)在与昆虫形成广义上的共生关系体内,起到影响昆虫种群建立、协同克服寄主抗性、引起树木病害和造成木质部变色的作用^[6-7],带来直接和间接的经济损失。长喙壳类真菌主要包括微囊目(Microascales)的长喙壳属(*Ceratocystis*)、穴喙壳属(*Sphaeronaemella*)、*Gondwanamyces* 属和 *Cornuvesica* 属,以及蛇口壳目(Ophiostomatales)的蛇口壳属(*Ophiostoma*)、*Grosmannia* 属和拟长喙壳属(*Ceratocystiopsis*),以及对应于这些有性型的多种无性属^[8]。

自 Hartig 首次发现真菌与小蠹虫的伴生现象以来^[9],二者之间的协同进化关系得到了越来越多的研究材

料和个例的证实。小蠹虫和真菌各自形成了特定的形态构造以利于保持双方共生体的延续,其中小蠹虫体表形成的贮菌器(mycangium)是这种进化最有力的证据^[6]。

齿小蠹属目前包括约 36 个种,全部分布于北半球的针叶林内。其中 13 个种分布于欧亚大陆^[10]。形态和亲缘关系十分相似的 3 种齿小蠹,云杉八齿小蠹(*Ips typographus*)、欧洲落叶松八齿小蠹(*I. cembrae*)和亚洲落叶松八齿小蠹(*I. subelongatus*)作为欧亚大陆针叶林内的种类,引起了大范围的危害。云杉八齿小蠹在欧洲被列为危害最为严重的十大蠹虫之首^[11],目前发现与云杉八齿小蠹及其日本变种(*I. typographus* f. *japonicus*)相伴生的长喙壳真菌约有 30 种,其中形成稳定伴生关系的主要是 *Ceratocystis polonica* (Siem.) C. Moreau,是伴生菌区系中的先锋种,往往在真菌侵染寄主的最前端分离率最高。*Ceratocystis polonica* 是一种强致病性病原菌^[12],其致病性增强了害虫的危害性^[6,13]。

在欧洲目前发现 11 种长喙壳真菌与欧洲落叶松八齿小蠹伴生^[6,14-18],其中与强致病性病原菌 *C. laricicola* 形成稳定的伴生关系。日本也较早开展了落叶松八齿小蠹伴生菌的研究^[19],到目前报道与 12 个长喙壳真菌的种类伴生^[20-22]。尽管最初认为这两种小蠹虫属同种,而且都可与病原菌 *C. laricicola* 稳定伴生,但随后借助 DNA 序列为工具的系统发育学研究揭示了害虫和伴生菌分属两个不同种,在日本与亚洲落叶松八齿小蠹伴生的主要真菌为 *Ceratocystis fujensis*^[23],而不是 *C. laricicola*。

上述 3 种八齿小蠹形态极为相似,与此类似的是,3 种小蠹虫各自稳定的伴生菌 *C. polonica*、*C. laricicola* 和 *C. fujensis* 之间形态上也几乎无法区别,但基于多基因序列分析的系统发育分析清晰的表明它们属于不同种,而且它们也可以通过寄主、媒介昆虫和地理区域的分化特征进行区分^[23]。即小蠹虫与伴生真菌在长期协同进化过程中,特定种的小蠹虫只与特定种的真菌形成稳定的“种特异性伴生”关系假说(species-specific association of fungi with bark beetles)^[24-26]。

我国近几年也对落叶松八齿小蠹伴生菌有一些零星的研究和报道^[27-29],但缺乏系统性。本研究通过对 3 种异域分布的落叶松林内的齿小蠹伴生菌进行系统调查和分析,期望验证种的特异性伴生假说,以明确稳定伴生的长喙壳病原菌在我国森林生态系统中的分布范围,为森林病虫害的有效治理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 标本采集

于 2011—2012 年,分别在内蒙古阿荣旗,根河,五岔沟,赤峰;黑龙江省古城,伊春;吉林长白,辽宁抚顺等地区选择兴安落叶松、长白落叶松和华北落叶松进行标本采集。标本包括落叶松八齿小蠹虫体标本与坑道标本。

1.2 真菌分离纯化

采用组织分离法进行伴生真菌分离。将坑道标本切成 3 mm×3 mm 大小的组织块,用 1.5% 的次氯酸钠溶液(每 100 mL 含 1 滴吐温 20)进行表面消毒处理 1 min,再用无菌水冲洗 3 次。无菌滤纸吸干组织块上的水分后接于 2% 的无菌水琼脂培养基上进行真菌分离培养。利用 1.5% 的次氯酸钠溶液对落叶松八齿小蠹进行体表消毒 30 s,用无菌的镊子将虫体置于 2% 水琼脂培养基上进行虫体表面真菌分离。

采用菌丝先端纯化法对组织分离培养的真菌进行纯化,纯化后得到的真菌接于 2% MEA 培养基,置于 25℃ 恒温培养箱中,黑暗条件下培养。

1.3 菌株形态学

将分离纯化得到的菌株在 2% MEA 培养基上培养 20 d,每天记录菌丝形态,生长情况,待其长出子实体释放出孢子后,在显微镜下观察菌株的子囊壳、子囊、子囊孢子、分生孢子梗、分生孢子的形态特征,并进行描述、测量和拍摄。每一形态特征测量 50 组数据进行分析处理。

1.4 菌株生长速率测定

用直径为 5 mm 的无菌打孔器从在 2% MEA 培养基上旺盛生长的实验菌株边缘切下菌饼,置于相同培养

基成分的培养皿中央。菌饼生长菌丝的一面与培养基直接接触,每个菌株做 3 个重复,25 ℃ 黑暗条件下恒温培养,每天观察菌落生长情况,采用十字交叉法测量菌落直径。

1.5 DNA 提取

对纯化所得菌株采用 2%液体 PDA 培养基置于 25 ℃摇床下黑暗培养 7 d,挑取适量菌丝于滤纸上,用无菌水冲洗菌丝至滤液澄清,菌丝烘干,备用。DNA 提取采用 CTAB 法用植物基因组 DNA 提取试剂盒进行提取。

1.6 PCR 扩增

试验采用 25 μL 的 PCR 反应体系:模板 1 μL,浓度 1 μmol/L 的引物各 1 μL,2×Taq PCR MasterMix(0.1 U Taq Polymerase/μL, 500 μmol/L dNTP each, 20 mmol/L Tris-HCL (pH8.3), 100 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂)12.5 μL, 9.5 μL ddH₂O。不同 DNA 基因片段的扩增条件及所需引物如表 1 所示^[27]。PCR 产物采用 2.2%琼脂糖凝胶电泳检测,条带单一、清晰的送往北京宝锐通生物科技有限公司进行双向测序。

表 1 基因扩增所需引物、引物序列及扩增程序统计表
Table 1 The information about the Primers and the PCR conditions

扩增序列 Gene	引物 Primers	引物序列 Primer sequences	扩增条件 PCR amplification conditions
ITS	ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	94 ℃ 3 min,94 ℃ 1 min,55 ℃ 45 s
	ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	72 ℃ 1 min,循环 35 次;72 ℃ 4 min
β-tubulin	Bt1-a	5' TTCCCCGCTCTCCACTTCTTCATG 3'	95 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 50 s
	Bt1-b	5' GACGAGATCGTTCATGTTGAAGTC 3'	72 ℃ 2 min,循环 40 次;72 ℃ 5 min
MAT-2 HMG box gene	COER2-1	5' GACACCAAGACGTCAAAGCC 3'	95 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 50 s
	COER2-2	5' GCTTTTCTTGTAAGTTTCAGC 3'	72 ℃ 2 min,循环 40 次;72 ℃ 5 min

1.7 系统发育分析

上述获得的基因序列首先在基因库 (GenBank) 内利用 BLAST 进行搜索比对,获得与已知序列初步的相关性,下载相关已发表序列,连同本实验获得的 19 株菌株的核苷酸序列利用 ClustalX 2.0 进行序列比对 (Alignment)。经过比对完成的序列利用最大简约法 (PAUP×version 4.0b10) 以及贝叶斯方法 (MrBayers3.1.2) 进行系统发育分析,建立系统发育树。贝叶斯系统发育树构建时采用 MCMC 算法,运行 5000000 代,模型的选择采用 MrModeltest2.3 软件进行检测。采用 PAUP 软件对 ITS,β-tubulin 以及 MAT-2 HMG box 三段基因进行同质性检验,判断三段基因是否可以用来构建基因联合树。选取 *Ceratocystis polonica* 作为外群^[23]。实验所采用菌株及构建系统发育树所需参考菌株信息如表 2 所示。

表 2 实验用 *Ceratocystis* 属菌株及构建系统发育树参考菌株信息表

Table 2 Fungal isolates obtained from different hosts *Ips subelongatus* infested and isolates of known species included for reference purposes

物种 Species identit	菌株编号	寄主 Host 植物/昆虫 Plant/Insect	采集 Origin 地	采集者 Collector	分离日期 Date of isolation	登录号 Genbank No. *		
						ITS	β-tubulin	MAT-2 HMG box
富士长喙壳 <i>Ceratocystis fujensis</i>	CXY1505	兴安落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>Larix gmelini/Ips subelongatus</i>	内蒙古根河	本文	2011	KC762579	KF773013	KJ634488
	CXY1506	兴安落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>Larix gmelini/Ips subelongatus</i>	内蒙古根河	本文	2011	KC762578	—	—
	CXY1507	兴安落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>Larix gmelini/Ips subelongatus</i>	内蒙古根河	本文	2011	KC762577	KF773015	KJ634489
	CXY1508	兴安落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>Larix gmelini/Ips subelongatus</i>	内蒙古根河	本文	2011	KC762576	KF773014	KJ634490
	CXY1509	兴安落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>Larix gmelini/Ips subelongatus</i>	内蒙古根河	本文	2011	KC762575	—	—
	CXY1515	华北落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L.principis-rupprechtii/I.subelongatus</i>	内蒙古黄岗梁	本文	2011	KC762574	KF773017	KJ634494

续表

物种 Species identit	菌株编号	寄主 Host 植物/昆虫 Plant/Insect	采集 Origin 地	采集者 Collector	分离日期 Date of isolation	登录号 Genbank No. *		
						ITS	β-tubulin	MAT-2 HMG box
<i>C. polonica</i>	CXY1516	华北落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L.principis-rupprechtii/I.subelongatus</i>	内蒙古黄岗梁	本文	2011	KC762573	KF773018	KJ634495
	CXY1517	华北落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L.principis-rupprechtii/I.subelongatus</i>	内蒙古黄岗梁	本文	2011	KC762572	KF773019	KJ634496
	CXY1518	华北落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L.principis-rupprechtii/I.subelongatus</i>	内蒙古黄岗梁	本文	2011	KC762571	—	—
	CXY1514	华北落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L.principis-rupprechtii/I.subelongatus</i>	内蒙古黄岗梁	本文	2011	KC762570	—	KJ634493
	CXY1511	华北落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L.principis-rupprechtii/I.subelongatus</i>	内蒙古黄岗梁	本文	2011	KC762569	—	—
	CXY1512	华北落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L.principis-rupprechtii/I.subelongatus</i>	内蒙古黄岗梁	本文	2011	KC762568	KF773020	KJ634491
	CXY1513	华北落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L.principis-rupprechtii/I.subelongatus</i>	内蒙古黄岗梁	本文	2011	KC762567	—	KJ634492
	CXY1510	华北落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L.principis-rupprechtii/I.subelongatus</i>	内蒙古黄岗梁	本文	2011	KC762566	KF773016	—
	CXY1522	长白落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L. olgensis/ I. subelongatus</i>	黑龙江古城	本文	2012	KC762584	—	—
	CXY1519	长白落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L. olgensis/ I. subelongatus</i>	黑龙江古城	本文	2012	KC762583	KF773023	KJ634497
	CXY1520	长白落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L. olgensis/ I. subelongatus</i>	黑龙江古城	本文	2012	KC762582	—	—
	CXY1521	长白落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L. olgensis/ I. subelongatus</i>	黑龙江古城	本文	2012	KC762581	KF773022	KJ634498
	CXY1523	长白落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L. olgensis/ I. subelongatus</i>	黑龙江古城	本文	2012	KC762580	KF773021	KJ634499
	CMW5026	欧洲云杉/云杉八齿小蠹 <i>Picea abies/ Ips typographus</i>	澳大利亚,	T. Kirisits	1997	AY233907	AY233932	AY233959
	CMW8845	樟子松/横坑切梢小蠹 <i>Pinus sylvestris/ Tomicus minor</i>	澳大利亚	T. Kirisits	1998	AY233890	AY233926	AY233956
	CMW2284	日本鱼鳞松/ 亚洲落叶松八齿小蠹变种 <i>P.jezoensis/I.typographus japonicus</i>	日本,北海道	Y. Yamaoka	1989	AY233894	AY233935	AY233964
	CMW2210	日本鱼鳞松/ 亚洲落叶松八齿小蠹变种 <i>P.jezoensis/ I.typographus japonicus</i>	日本,北海道	Y. Yamaoka	1990	AY233897	AY233936	AY233960
	CMW8830	欧洲云杉/云杉八齿小蠹 <i>Picea abies/ Ips typographus</i>	挪威	T. Kirisits H. Solheim	1992	AY233889	AY233929	AY233955
	CMW8873	欧洲云杉/云杉八齿小蠹 <i>Picea abies/ I. typographus</i>	挪威	T. Kirisits H. Solheim	1990	AY233888	AY233928	AY233954
<i>C. laricicola</i>	CMW2272	日本鱼鳞松/ 亚洲落叶松八齿小蠹变种 <i>P.jezoensis/ I.typographus japonicus</i>	日本,北海道	Y. Yamaoka	1990	AY233893	AY233934	—
	CMW7151	欧洲云杉/云杉八齿小蠹 <i>Picea abies/ I. typographus</i>	澳大利亚	R. Grubelnik T. Kirisits	1997	AY233896	—	—
	CMW10522	欧洲云杉/云杉八齿小蠹 <i>Picea abies/ I. typographus</i>	波兰	W. Siemaszko	1938	AY233898	AY233933	—
	CMW7748	欧洲云杉/云杉八齿小蠹 <i>Picea abies/ I. typographus</i>	捷克共和国	T. Kirisits R. Jakus	2001	AY233899	AY233939	—
	CMW7143	<i>Picea abies/ I. amitinus</i>	澳大利亚	T. Kirisits	1997	AY233904	—	—
	CMW4540	欧洲落叶松/欧洲落叶松八齿小蠹 <i>L. decidua/I. cembrae</i>	苏格兰,阿瑟尔	T. Kirisits et. al	1997	AY233910	AY233947	AY233966
	CMW4546	欧洲落叶松/欧洲落叶松八齿小蠹 <i>L. decidua/I. cembrae</i>	苏格兰,阿瑟尔	T. Kirisits et. al	1997	AY233911	AY233945	AY233970

续表

物种 Species identit	菌株编号	寄主 Host 植物/昆虫 Plant/Insect	采集 Origin 地	采集者 Collector	分离日期 Date of isolation	登录号 Genbank No. *		
						ITS	β-tubulin	MAT-2 HMG box
<i>C. fujensis</i>	CMW3221	欧洲落叶松/欧洲落叶松八齿小蠹 <i>L. decidua/I. cembrae</i>	苏格兰,阿瑟尔	T. Kirisits et. al	1997	AY233921	AY233943	—
	CMW1016	欧洲落叶松/欧洲落叶松八齿小蠹 <i>L. decidua/I. cembrae</i>	苏格兰	D. B. Redfern	—	AY233915	AY233946	—
	CMW5064	欧洲落叶松/欧洲落叶松八齿小蠹 <i>L. decidua/I. cembrae</i>	澳大利亚	T. Kirisits	1997	AY233912	—	—
	CMW7760	欧洲落叶松/欧洲落叶松八齿小蠹 <i>L. decidua/I. cembrae</i>	澳大利亚	T. Kirisits	1997	AY233918	AY233942	AY233969
	CMW7759	欧洲落叶松/欧洲落叶松八齿小蠹 <i>L. decidua/I. cembrae</i>	澳大利亚	T. Kirisits	1998	AY233919	AY233941	AY233965
	CMW1965	日本落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L. kaempferi/I. subelongatus</i>	日本,富士山	M.J.Wingfield Y.Yamaoka	1992	AY233922	AY233950	AY233972
	CMW1969	日本落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L. kaempferi/I. subelongatus</i>	日本,富士山	M.J.Wingfield Y.Yamaoka	1993	AY233923	AY233951	AY233967
	CMW1952	日本落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L. kaempferi/I. subelongatus</i>	日本,富士山	M.J.Wingfield Y.Yamaoka	1994	AY233924	AY233949	AY233971
	NMG_11	兴安落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>Larix gmelini/Ips subelongatus</i>	内蒙古	X.Zhou	2008	HM776416	—	—
	HLJ_1	长白落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L. olgensis/ I. subelongatus</i>	黑龙江	X. Zhou	2009	HQ707818	—	—
<i>C. pinicola</i>	HLJ_2	长白落叶松/亚洲落叶松八齿小蠹 <i>L. olgensis/ I. subelongatus</i>	黑龙江	X. Zhou	2009	HQ707819	—	—
	CMW3273	欧洲云杉 <i>Picea abies</i>	挪威	H. Solheim	1994	AY233925	AY233952	AY233974

内蒙古根河实验林场,经纬度:121°37'12"E,50°50'15"N;内蒙古克什克腾旗黄岗梁实验林场,经纬度:117°31'14"E 43°35'08"N;黑龙江古城镇湖水林场,经纬度:130°13'06"E 45°23'34"N;—:该序列信息无

2 结果与分析

2.1 真菌分离和形态学鉴定

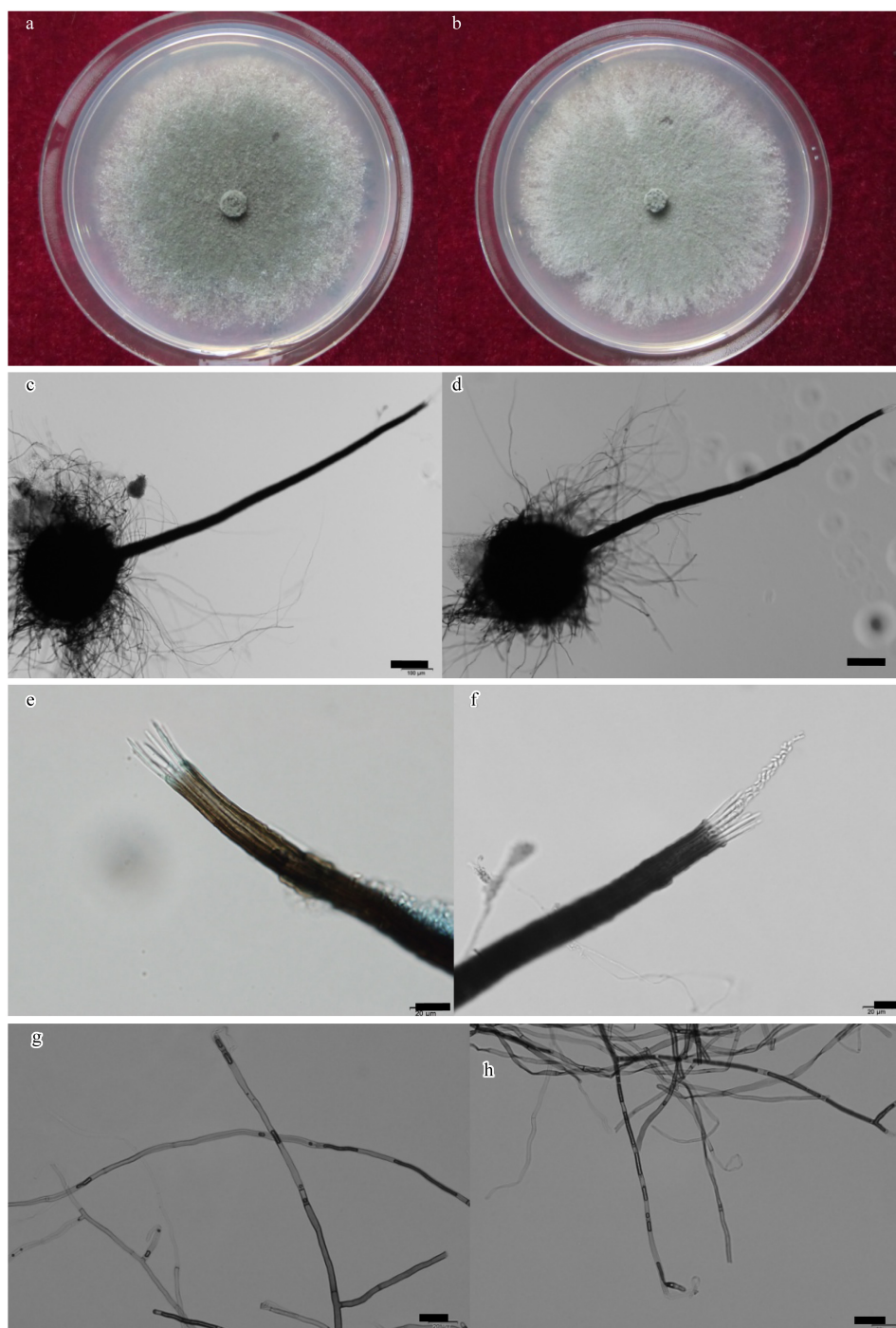
实验从 103 份标本上共分离得到长喙壳类真菌 157 株,其中包括 *Ceratocystis* 属真菌 19 株,这些菌株在生长速率、培养特征和形态学特征上表现出一致性,可知 19 株真菌为同一个种。19 株 *Ceratocystis* 属真菌菌株分别在内蒙古根河、黄岗梁和黑龙江古城 3 个地区分离得到,分离率分别为 40%、31%和 22%。

通过对上述菌株进行生理学以及形态学观察分析结果显示,在 25℃ 黑暗恒温,2%MEA 培养基培养条件下,菌株在第 4 天到第 5 天生长速率最快,达到 21 mm/d,在第 7 天时可长满直径为 85 mm 的一次性塑料培养基。在 2%MEA 培养基上新生菌丝灰白色,中央橄榄绿色,菌丝生长较快,菌落中央呈绒毡状,致密,较厚(图 1-a,图 1-b)。

试验分离纯化得到的菌株在形态上基本一致,选用菌株 CXY1506 和 CXY1517 进行详细的形态学观察。子囊壳褐色至黑色,基部球形,表生,子囊壳直径 132—274 μm(图 1-c,图 1-d),着生大量褐色菌丝。菌丝长度 250—626 μm(图 1-g,图 1-h)。颈暗褐色至黑色,直立或稍弯曲,长 360—1201 μm,壁光滑,圆锥状,由颈基部向颈顶部逐渐变细,颈基部宽 32—58 μm,顶部宽 10—24 μm(图 1-c,图 1-d)。孔口缘丝透明,向外稍倾斜,孔口缘丝长 25—57 μm(图 1-e,图 1-f)。子囊原囊壁渐消解,子囊孢子长 3.5—6.1 μm,宽 1.2—2.4 μm(图 1-i),椭圆形,有胶质鞘,单细胞透明。分生孢子圆柱形,单细胞透明,长 7.6—22.7 μm,宽 3.5—7.8 μm(图 1-j)。显微形态观察特征显示与 *Ceratocystis fujensis*^[23] 无明显区别。

2.2 系统发育分析

用 ClustalX 2.0 对 44 个 ITS 序列进行比对,利用 PAUP * version 4.0b10 最大简约法分析结果显示,比对的 547 个特征视为无序且权重相同,其中恒量特征 492 个,29 个有简约信息的变量特征。利用最大简约法构建的联合树步长(Tree length)为 71,一致性指数(Consistency index, CI)为 0.7587,保留指数(Retention index, RI)为 0.9548,趋同性指数(Homoplasy index, HI)为 0.2143,可调一致性指数(Rescaled consistency index, RC)为 0.8337。MP 树表明 43 个内群分为 3 个主要分支,分别为 *Ceratocystis polonica*, *C. fujiensis*, *C. laricicola* (图 2)。本实验分离所得菌株与日本 *C. fujiensis* 3 个菌株以及周秀华等^[28]分离得到的 *C. fujiensis* 菌株聚集为 1 个分支,其中周秀华所分离的菌株构成 1 个亚分支,与其他 *C. fujiensis* 均有 4 个变化;CXY1510 和 CXY1512 构成一个亚分支,与其他 *C. fujiensis* 均有 3 个变化;日本菌株 CMW1952 和 CMW1969 与中国菌株 CXY1517,



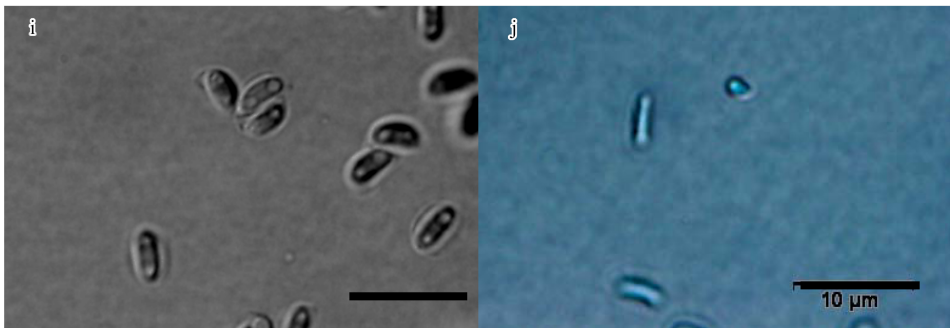


图 1 *Ceratocystis fujiensis* 形态学特征图(CXY1506,CXY1517)

Fig 1 Light micrographs of *Ceratocystis fujiensis*(CXY1506,CXY1517)

a.菌株 CXY1517 在 MEA 培养基上 25 ℃ 条件下培养 5 d 的菌落形态;b.菌株 CXY1506 在 MEA 培养基上 25 ℃ 条件下培养 5 d 的菌落形态;
c,d.子囊壳(100 μm);e,f.孔口缘丝(20 μm);g,h.营养菌丝(20 μm);i.子囊孢子(10 μm);j.分生孢子(10 μm)

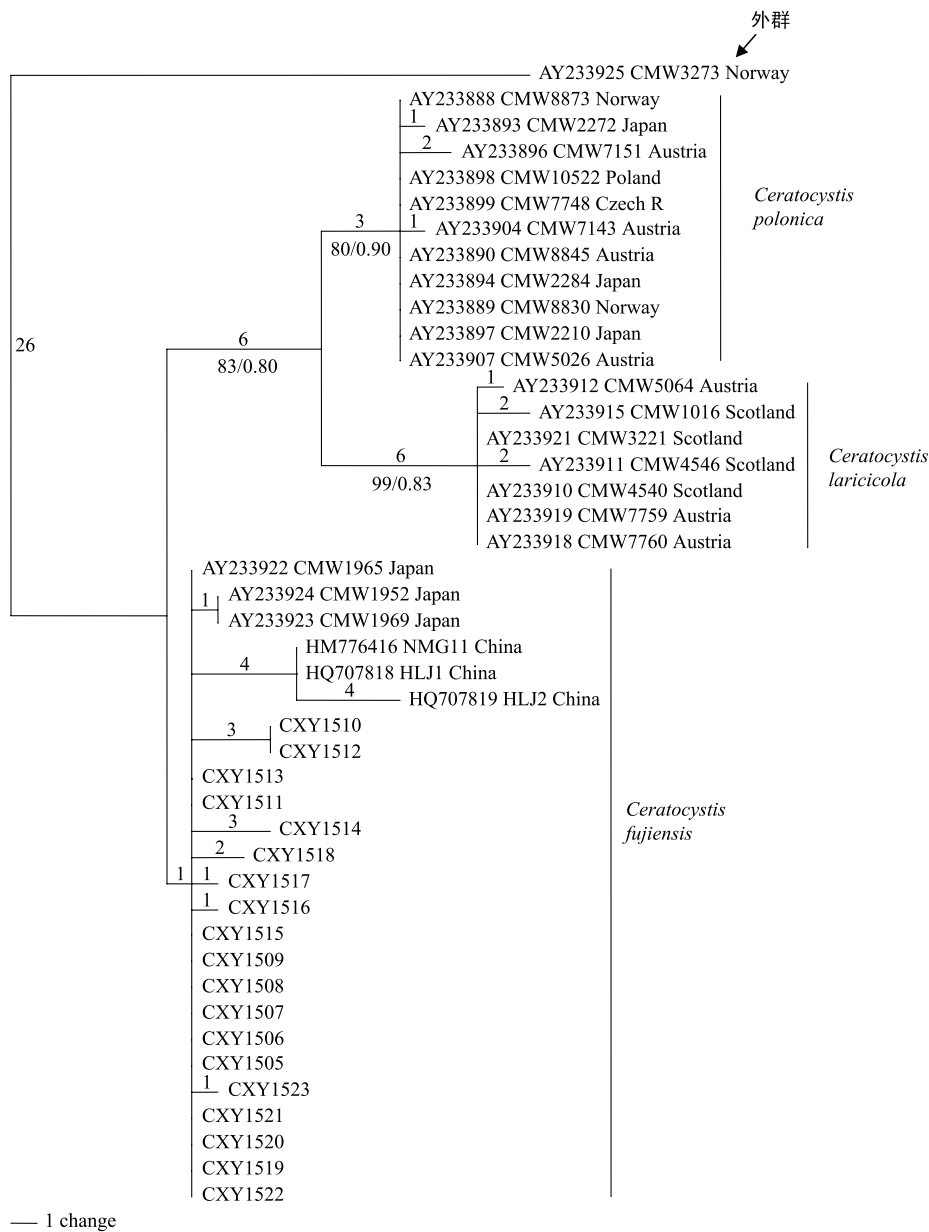


图 2 基于 ITS 序列采用 PAUP 软件构建的最大简约树(MP 树)

Fig.2 Phylogram obtained from DNA sequence data of the ITS region with the maximum parsimony method

CXY1516, CXY1523 均有 1 个变化;而 CXY1518 具有两个变化。基于 ITS 基因的 MP 树 3 个分支的节点支持率(BS)均高于或等于 80%(图 2)。采用贝叶斯方法进行贝叶斯树的构建,采用 MCMC 算法,共运行 5000000 代,构建的系统发育树与 MP 树拓扑结构完全一致,贝叶斯分析结果显示后验概率(PP)均高于或等于 0.80。图 2 中最后显示节点支持率为 BS/PP。

对要进行系统发育分析的 3 个位点的 DNA 序列进行同质性检验(P value = 0.451),发现 3 个位点的 DNA 序列可以进行基因联合树的构建。利用 ClustalX 2.0 对 ITS、 β -tubulin 以及 MAT-2 HMG box 三段基因进行 DNA 序列比对。最大简约法分析比对的 1269 个特征视为无序且权重相同,结果显示,其中恒量特征为 1204 个,32 个无简约信息的变量特征以及 33 个有简约信息的变量特征。利用最大简约法构建的联合树步长(Tree length)为 72,一致性指数(CI)为 0.8974,保留指数(RI)为 0.9778,趋同性指数(HI)为 0.1026,可调一致性指数(RC)为 0.9325,得到各节点支持率为 BS。MP 树表明 23 个内群分为 3 个主要分支,分别对应种 *C. polonica*, *C. fujiensis*, *C. laricicola*(图 3)。本实验分离所得菌株与日本 3 个菌株聚为 1 支,最后节点支持率 BS/PP = 94/0.98。其中本实验分离到的菌株与日本菌株 CMW1965 聚集为 1 个亚分支,后验概率 PP = 1.00,节点支持率 BS = 96;其中菌株 CXY1512, CXY1505, CXY1507 构成 1 个亚分支, CXY1516 和 CXY1517 构成 1 个亚分支,与其他 *C. fujiensis* 均有 1 个变化。CXY1508, CXY1515, CXY1523, CMW1519, CMW1521 具有一致性,而日本菌株 CMW1969 和 CMW1952 构成 1 个单独的分支。该 MP 联合树 3 个分支的节点支持率(BS)均高于或等于 94%(图 3)。利用 MrModeltest2.3 进行模型检测,在 AIC(Akaike Information Criterion)标准下,获得最佳模型 HKY+I。贝叶斯系统发育树构建方法采用 MCMC 算法,共运行 5000000 代,构建的系统发育树拓扑结构

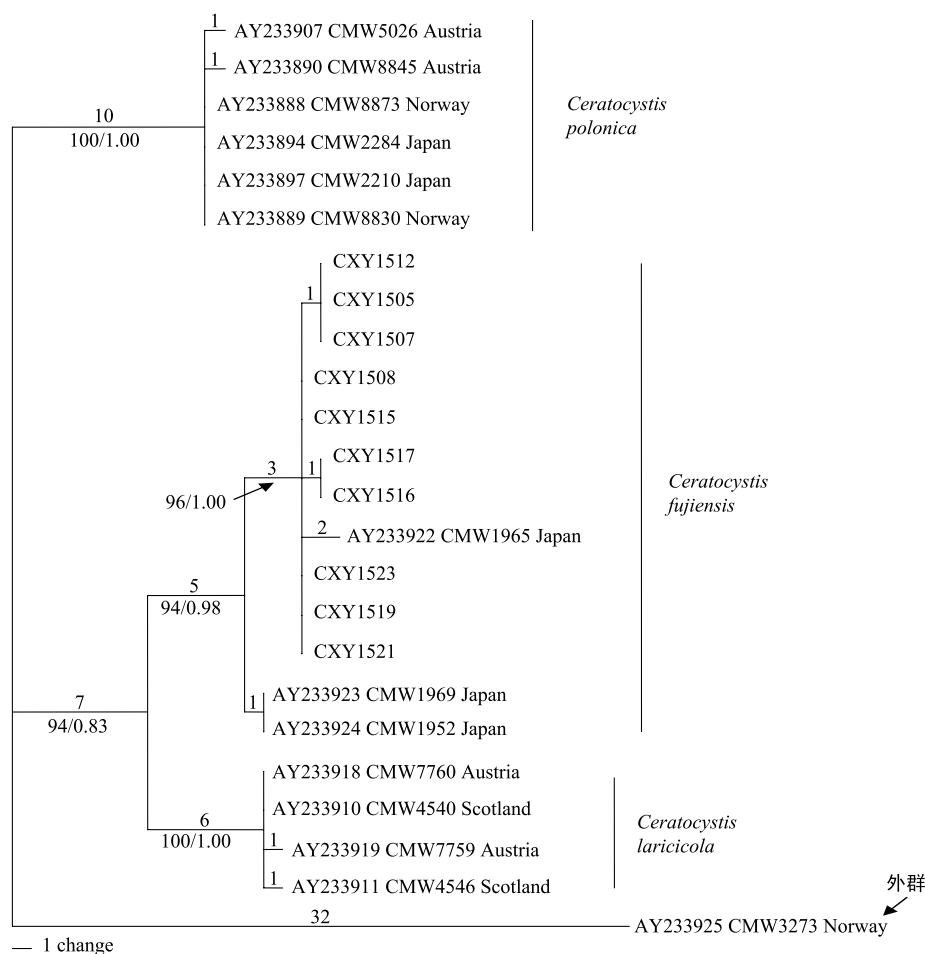


图 3 基于 ITS、 β -tubulin 以及 MAT-2 HMG box 三段基因构建的 MP 联合树

Fig.3 Phylogram obtained from MP analyses of the ITS, β -tubulin and MAT-2 HMG box sequence data

与 MP 树完全一致,结果显示后验概率(PP)均高于或等于 0.83,多数节点后验概率值为 1.00。

3 结论与讨论

本研究对我国东北异域分布的 3 种落叶松林内的落叶松八齿小蠹危害的寄主坑道组织和虫体标本进行采集和系统分离长喙壳真菌,获得的 *Ceratocystis* 属菌株进行生理学特性、菌落特征、微观形态学的观察,以及基于 ITS、 β -tubulin、MAT-2 HMG box 多位点 DNA 序列的系统发育分析。研究结果表明,实验分离得到 *Ceratocystis fujensis* 菌株 19 株。该种首先在日本发现^[23],已与亚洲落叶松八齿小蠹形成稳定的伴生关系,是伴生菌区系中的先锋种和致病力最强的病原菌,人工接种条件下可以致死 30 年生的日本落叶松(*Larix kaempferi*)^[21-22]。我国学者曾在长白落叶松和兴安落叶松的小蠹虫坑道分离到 3 株该病原菌^[28]。本研究首次从大兴安岭的兴安落叶松,长白山地区的长白落叶松和大兴安岭余脉不同地域分布的华北落叶松林内系统发现 *C. fujensis*,表明该病原性真菌在我国东北、华北落叶松林内广泛分布,与落叶松八齿小蠹形成稳定的伴生关系。

在欧洲分布的云杉八齿小蠹伴生菌 *C. polonica* 和落叶松八齿小蠹伴生菌 *C. laricicola* 具有明显的寄主分化特征,接种试验证明只能在各自的寄主(欧洲云杉 *Picea abies* 和欧洲落叶松 *Larix decidua*)上造成显著的病斑,而无法成功侵染另一寄主,即形成了“*Picea abies*-*Ips typographus*-*C. polonica*”和“*Larix deciduas* -*Ips cembrae*-*C. laricicola*”的协同进化关系^[30]。日本也发现落叶松八齿小蠹伴生菌的分化特征,即“*Larix kaempferi*-*Ips subelongatus*-*C. fujensis*”的协同进化^[23]。本项研究结果显示 *C. fujensis* 在我国也与危害 3 种本土落叶松寄主的落叶松八齿小蠹形成稳定的伴生关系,支持了这种协同进化关系,即特定种的小蠹虫与特定种的真菌稳定伴生形成了种特异性伴生的进化趋势。尚需进一步研究 *C. fujensis* 和 *C. laricicola* 在不同落叶松寄主(欧洲落叶松和亚洲落叶松)上的交叉接种,以及 *C. fujensis* 和 *C. polonica* 在云杉(欧洲云杉、日本云杉等)和亚洲落叶松(包括日本落叶松、兴安落叶松、长白落叶松和华北落叶松等)上的交叉接种试验,以验证这种协同进化形成的伴生菌的寄主分化特征。

伴生菌适应寄主植物和小蠹虫的分化潜力已在不同地理(或寄主)种群中发现。日本的云杉八齿小蠹(*I. typographus* f. *japonicus*)被视为欧洲种的 1 个变种,两个种群间存在明显的遗传隔离^[31-32],危害不同的云杉寄主;尽管二者均与 *C. polonica* 形成稳定的伴生关系,但该伴生菌在两个地区存在显著的遗传差异,分化为明显的两个地理(或寄主)种群^[33],即“*Picea abies* - *Ips typographus* - *C. polonica* 欧洲种群”和“*Picea jezoensis* (日本云杉)-*I. typographus* f. *japonicus*-*C. polonica* 日本种群”。

尽管我国落叶松八齿小蠹与日本落叶松八齿小蠹属为同一种,但其线粒体基因序列显示二者存在不同单倍体型的差异^[18],而且我国落叶松八齿小蠹的长白落叶松种群和兴安落叶松种群间存在信息素响应的二型现象,可能二者为不同的地理(或寄主)种群^[26]。亚洲落叶松八齿小蠹存在着丰富的种下分化现象。由基于 ITS 序列的 MP 树(图 2)可见,*C. fujensis* 表现出丰富的种内分化。同时基于多 DNA 序列的联合系统发育分析(图 3)可见,相比较地域分布更为广泛的 *C. polonica* 和 *C. laricicola*,*C. fujensis* 却表现出更加丰富的种内分化,聚类出两个亚分支,一支为日本的两个菌株,另一分支为日本的一个菌株和中国的所有菌株聚在一起;尽管中国菌株并未表现出 3 种寄主的分化特征,但危害长白落叶松的落叶松八齿小蠹的伴生菌种群表现出更加一致的 DNA 序列(图 3)。这种伴生菌丰富的种下分化显示出与其寄主和媒介昆虫丰富的遗传多样性的平行结构,值得从更大的样本量和更全面的分析,例如调查全基因组的遗传多样性,揭示 *C. fujensis* 和小蠹虫种群下是否有隐存种或种群分化的存在,以验证是否也存在着特异性伴生的进化现象。

参考文献(References):

- [1] 杨静莉,林强,陈国发. 落叶松八齿小蠹的危险性分析. 东北林业大学学报,2007, 35(3): 60-63.
- [2] 胡新生, Ennos R A, 王笑山. 论我国兴安落叶松、长白落叶松及华北落叶松种间遗传进化关系. 林业科学,1999, 35(3): 84-96.
- [3] 萧刚柔. 中国森林昆虫. 北京:中国林业出版社,1992.

- [4] 殷惠芬, 黄复生. 中国经济昆虫志. 北京: 科学出版社, 1984, 54-55.
- [5] 国家林业局 2013 年第 4 号公告 http://www.forestry.gov.cn/portal/main/govfile/13/govfile_1983.htm [2013-3-15]
- [6] Kirisits T. Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi// Lieutier F, Day K R, Battisti A, Grégoire J C, Evans H F, eds. Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004: 181-236.
- [7] Wingfield M J, Seifert K A, Webber J F. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity. Minnesota, USA: American Phytopathological Society, 1993.
- [8] 吕全. 中国红脂大小蠹伴生菌的系统发育及其生物生态学习性[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2007.
- [9] Hartig T. Ambrosia des Bostrichus dispar. Allgemeine Forst-Und Jagdzeitung, 1844, 13: 73-73.
- [10] Cognato A I, Sun J H. DNA based cladograms augment the discovery of a new *Ips* species from China (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Cladistics, 2007, 23(6): 539-551.
- [11] Grégoire J C, Evans H. Damage and control of BAWBILT organisms an overview// Lieutier F, Day K R, Battisti A, Grégoire J C, Evans H F, eds. Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004: 19-37.
- [12] Christiansen E. *Ceratocystis polonica* inoculated in Norway spruce: Blue-staining in relation to inoculum density, resinosis and tree growth. European Journal of Forest Pathology, 1985, 15(3): 160-167.
- [13] Kirisits T. Fungi isolated from *Picea abies* infested by the bark beetle *Ips typographus* in the Białowieża forest in north-eastern Poland. Forest Pathology, 2010, 40(2): 100-110.
- [14] Aghayeva D N, Wingfield M J, deBeer Z W, Kirisits T. Two new *Ophiostoma* species with *Sporothrix* anamorphs from Austria and Azerbaijan. Mycologia, 2004, 96(4): 866-878.
- [15] Jankowiak R, Rossa R, Mista K. Survey of fungal species vectored by *Ips cembrae* to European larch trees in Raciborskie forests (Poland). Czech Mycology, 2007, 59(2): 227-239.
- [16] Redfern D B. The roles of the bark beetle *Ips cembrae*, the woodwasp *Urocetus gigas* and associated fungi in dieback and death of larches// Wilding N, Collins N M, Hammond P M, Webber J F, eds. Insect-Fungus Interactions. 14th Symposium of the Royal Entomological Society of London in collaboration with the British Mycological Society. London: Academic Press, 1989: 195-204.
- [17] Redfern D B, Stoakley J T, Steele H, Minter D W. Dieback and death of larch caused by *Ceratocystis laricicola* sp. nov. following attack by *Ips cembrae*. Plant Pathology, 1987, 36(4): 467-480.
- [18] Stauffer C, Kirisits T, Nussbaumer C, Pavlin R, Wingfield M J. Phylogenetic relationships between the European and Asian eight spined larch bark beetle populations (Coleoptera, Scolytidae) inferred from DNA sequences and fungal associates. European Journal of Entomology 2001, 98(1): 99-105.
- [19] Aoshima K. Studies on Wood-staining Fungi of Japan (in Japanese with English Summary) [D]. Tokyo: University of Tokyo, 1965.
- [20] Chung W H, Kim J J, Yamaoka Y, Uzunovic A, Masuya H, Breuil C. *Ophiostoma brevisculum* sp. nov. (Ophiostomatales, Ascomycota) is a new species in the *Ophiostoma piceae* complex associated with bark beetles infesting larch in Japan. Mycologia, 2006, 98(5): 801-814.
- [21] Yamaoka Y C, Hizai M, Chung W H, Masuya H. Constant association of ophiostomatoid fungi with the bark beetle *Ips subelongatus* invading Japanese larch logs. Mycoscience, 2009, 50(3): 165-172.
- [22] Yamaoka Y, Wingfield M J, Ohsawa M, Kuroda Y. Ophiostomatoid fungi associated with *Ips cembrae* in Japan and their pathogenicity of Japanese larch. Mycoscience, 1998, 39(4): 367-378.
- [23] Marin M, Preisig O, Wingfield B D, Kirisits T, Yamaoka Y, Wingfield M J. Phenotypic and DNA sequence data comparisons reveal three discrete species in the *Ceratocystis polonica* species complex. Mycological Research, 2005, 109(10): 1137-1148.
- [24] Francke-Grosmann H. Ectosymbiosis in wood-inhabiting insects// Henry S M, ed. Symbiosis. New York: Academic Press, 1967, 2: 141-205.
- [25] Paine T D, Raffa K F, Harrington T C. Interactions among *Scolytid* bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. Annual Review of Entomology, 1997, 42(1): 179-206.
- [26] Song L W, Zhang Q H, Chen Y Q, Zuo T T, Ren B Z. Field responses of the Asian larch bark beetle, *Ips subelongatus*, to potential aggregation pheromone components: disparity between two populations in northeastern China. Insect Science, 2011, 18(3): 311-319.
- [27] Paciura D, Zhou X D, DeBeer Z W, Jacobs K, Ye H, Wingfield M J. Characterisation of synnematosus bark beetle-associated fungi from China, including *Graphium carbonarium* sp. nov. Fungal Diversity, 2010, 40(1): 75-88.
- [28] 周秀华, 宋瑞清, 曹翠, 崔磊, 梁晓东, 潘建中, 朱元金, 胡振宇. 落叶松八齿小蠹伴生真菌 3 个菌株的鉴定及生物学生理学特性. 林业科学, 2011, 47(5): 82-86.
- [29] 周秀华, 宋瑞清, 周旭东, 崔磊, 曹翠. 落叶松八齿小蠹体内外和坑道内真菌类群. 菌物学报, 2011, 30(3): 400-407.
- [30] Harrington T C, Pashenova N V, McNew D L, Steimel J, Konstantinov M Y. Species delimitation and host specialization of *Ceratocystis laricicola* and *C. polonica* to larch and spruce. Plant Disease, 2002, 86(4): 418-422.
- [31] Sallé A, Arthofer W, Lieutier F, Stauffer C, Kerdellhué C. Phylogeography of a host-specific insect: genetic structure of *Ips typographus* in Europe does not reflect past fragmentation of its host. Biological Journal of the Linnean Society, 2007, 90(2): 239-246.
- [32] Stauffer C, Lakatos F. *Ips typographus* f. *japonicus* Nijima (Col., Scolytidae): a genetic analysis by allozymes and mitochondrial sequence data// Jandl R, Devall M, Khorchidi M, Schimpf E, Wolfrum G, Krishnapillay KB, eds. Pramaju Sdn. Bhd, Vol. 3, Poster Abstracts, Forests and Society: The Role of Research. XXI IUFRO World Congress. Kuala Lumpur, 2000: 397-397.
- [33] Marin M, Preisig O, Wingfield B D, Kirisits T, Wingfield M J. Single sequence repeat markers reflect diversity and geographic barriers in Eurasian populations of the conifer pathogen *Ceratocystis polonica*. Forest Pathology, 2009, 39(4): 249-265.