



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Institutt for Naturforvaltning

Masteroppgave 2014
30 stp

Sopper assosiert med *Pityogenes chalcographus*, *Polygraphus poligraphus* og *Tomicus piniperda*.

Fungi Associated with *Pityogenes chalcographus*,
Polygraphus poligraphus and *Tomicus piniperda*.

Ruben A. Lindseth

Forord

Grunnen til at jeg valgte å skrive denne oppgaven var at temaet virket interessant og jeg hadde lyst å fordype meg innenfor feltet. Jeg vil gjerne takke Halvor Solheim som har vært en bra veileder og spørreorgan om vanskelige valg og tema. Vil også takke Ari Hietala for hjelp ved skriving av metode, Pål Krokene for litteraturhjelp og Torstein Kvamme for hjelp med artsbestemmelser av biller.

For opplæring og hjelp ved lab arbeid vil jeg takke Helge Meissner, Anne E. Nilsen, Inger Heldal og Gro Wollebæk.

Takker så veldig mye til skogbrukssjef Tor Håvard Sund i Alta, skogbruksleder Jens Andreas Randem i SB-SKOG, virksomhetsleder Eivind Engh i Nannestad og skogbruksforeningen i Kongsberg for informasjon om hvor man kunne samle inn materiale. Uten dem hadde denne oppgaven blitt mye mer vanskelig å gjennomføre.

For hjelp med de ulike *Graphilbum* artene vil jeg takke Wilhelm De Beer som har vært til stor hjelp.

Ruben A. Lindseth

15.05.2015. NMBU

Sammendrag

Barkbillene *P. chalcographus*, *P. poligraphus* og *T. piniperda* er vanlig å finne assosiert med ophiostomatoide sopper i Norden og Europa. Ved hjelp av disse soppene er de i stand til å drepe levende trær, og soppene kan misfarge veden i tømmer som blir angrepet. Barkbiller kan også være assosiert med andre ulike sopper. Det ble gjort en undersøkelse om hvilke sopper som var tilknyttet billene. For å finne disse ble det tatt isolater fra billene *P.*

chalcographus og *P. poligraphus*, og vedprøver under gangsystemet til *T. piniperda*. De isolerte soppene ble gruppert etter morfologi. Fra disse morfologiske gruppene ble det valgt ut noen isolater for sekvensering, først i ITS regionen, deretter ble noen få sekvensert i β -tubelin regionen. Sekvensene ble kjørt gjennom GenBank for å identifisere soppene. De fleste artene var ophiostomatoide sopper, men enkelte andre sopparter var og til stede. Det ble isolert 14 ophiostomatoide sopparter til sammen og 19 andre arter. Disse artene var fordelt ut over de tre barkbillene og enkelte av dem ble bare isolert fra en art. Hos *P. chalcographus* og *P.*

poligraphus ble det isolert åtte ulike ophiostomatoide sopper fra hver av billene. I vedprøvene fra *T. piniperda* ble det kun isolert seks sopparter. Hver av billene hadde ulike sopparter som det dominerte mest av. Fra *P. chalcographus* ble det isolert mest av *Leptographium chlamydatum*, mens fra *P. poligraphus* ble det isolert mest av *Grosmannia piceiperda*. Fra *T. piniperda* ble det isolert mest av *Ophiostoma minus*, som var tilstede i nesten hver vedprøve. Antallet av ophiostomatoide sopparter som ble funnet i arbeidet med hovedoppgaven var bare en liten del av antallet sopparter som forskere hadde funnet assosiert med billene tidligere i Europa og Norden. De fleste av soppene som ble isolert i studiet har vist seg å være assosiert med billene fra tidligere forskninger. Men det er enkelte sopper med lav frekvens som ikke har blitt vist noen tilknytning til billene i Norden før nå.

Abstract

The bark beetles *P. chalcographus*, *P. poligraphus* and *T. piniperda* are known associates with the ophiostomatoide fungi in the North and Europe. With the help of these fungi the bark beetles are capable of killing living trees or create discoloration in the wood that is under attack. The bark beetles can also be associated with different kind of fungi's. There was done a study in finding what kind of fungi that were connected to the beetles. To find these fungi there were isolated samples of beetles from *P. chalcographus* and *P. poligraphus*, and wood samples from beneath the tunnels of *T. piniperda*. The isolated fungi were grouped after appearance. From these groups there were chosen some isolates for sequencing, first in the ITS-region, thereafter some were sequenced in the β -tubulin region. The sequences were run through the GenBank to find out which kind of specie that was present. The most species were ophiostomatoide fungi, but some other fungi were also present. It was isolated 14 different ophiostomatoide fungi and 19 other fungi. These species were divided among the three beetles, where some of the fungi only appeared on one of them. From the beetles *P. chalcographus* and *P. poligraphus* there were isolated eight different ophiostomatoide fungi, while from the wood samples from *T. piniperda* there were only isolated six fungi. Each of the beetles had a different kind of fungi that dominated the isolates. From *P. chalcographus* there were isolated most of *Leptographium chlamydatum*, while from *P. poligraphus* there were most of *Grosmannia piceiperda*. From *T. piniperda* there were isolated mostly *Ophiostoma minus*, it were isolated almost from every wood sample. The number of ophiostomatoide fungi species found in this main thesis were just a little bit of what earlier studies have found associated with the beetles. Most of the isolated fungi in the study have been associated with the beetles in earlier research. But some of the ophiostomatoide fungi with low frequency have never been shown any connection to the beetles in the North until now.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Innholdsfortegnelse	IV
Innledning.....	1
Biller assosiert med studiet.....	2
Assosierte sopper	3
Metode og materiale	5
Innsamling av materiale.....	5
Isolering og rendyrking av sopp	6
Biller	6
Treprøver.....	6
DNA- ekstraksjon	7
DNA sekvensanalysering.....	11
Resultater.....	11
<i>Pityogenes chalcographus</i>	13
<i>Polygraphus poligraphus</i>	14
<i>Tomicus piniperda</i>	15
Diskusjon.....	16
Oppsummering	22
Referanser.....	24
Figurer/Tabeller.....	28

Innledning

Barkbiller (Scolytidae) er kjent for å kunne forårsake store økonomiske tap for skogbruket (Kirisits, 2004). Det er imidlertid ikke alle arter barkbiller som er karakterisert som skadeinsekter, men enkelte arter kan angripe og drepe friske stående trær. Barkbiller er også en viktig vektor i det biologiske mangfoldet, da de kan endre landskapet blant annet ved å tynne ut bestander og lage åpninger i skogen (Raffa, et al., 2015).

Det er to typer skader barkbiller er kjent for å forårsake. Det ene er at de kan drepe levende trær. Det andre er at sopper de har med seg kan gi misfarging i tømmer, såkalt blåved (Repe, et al., 2013). For at et angrep på levende trær skal kunne bli vellykket, er det 3 hovedelementer som er avgjørende for billen. 1 – At billen klarer å gi fra seg sterke nok feromoner til å tiltrekke nok biller. 2 – Billene har utviklet en resistans mot trærnes forsvar. 3 – Hjelp av sopper (Krokene, 1996).

Angrep på trær skjer vanligvis ved at det er en pionerbille som sitter på trærne og slipper ut feromoner. Er det store forekomster av barkbiller i området strømmer de til og det forekommer et masseangrep (Krokene, 2015). Noen av de vanligste artene som kan angripe levende trær er *Pityogenes chalcographus* (Linnaeus, 1760) (Göthlin, et al., 2000) og *Polygraphus poligraphus* (Linnaeus, 1758) (Krokene & Solheim, 1998). *Ips typographus* (Linnaeus, 1758) (Solheim, 1992) er imidlertid den mest skadelige barkbillen i Europa på gran (*Picea abies* (L.) Karst) (Kirisits, 2004). *Tomicus piniperda* (Linnaeus, 1758) og *T. minor* (Hartig, 1834) (Solheim, et al., 2001) er to arter som er veldig vanlig på furu (*Pinus sylvestris* L.) (Solheim & Långström, 1991).

Levesettet og utviklingen til barkbiller er forskjellige. Noen er det vi kaller ambrosiabiller. Disse billene lever i symbiose med sopper som de har med seg i små kammer, mycangier, og som er en viktig næringskilde for billene (Raffa, et al., 2015).

Selve utviklingen til barkbiller kan være noe forskjellig, ved at noen arter er monogame og noen polygame. Hos monogame arter er det en enkelt hunnbille som er sammen med en hannbille. Hos polygame arter kommer det flere hunnbiller inn til et parringskammer hvor en hannbille befrukter dem (Raffa, et al., 2015) og de lager seg hver sin morgang. Langs morgangene legger hunnene eggene sine og når de klekker gnager larvene larveganger hvor

de spiser sopp og annen næring. I larvegangen forpupper også larven seg (Krokene, 2015). Når forpuppingen er ferdig graver de seg ut av barken og flyr avgårde (Raffa, et al., 2015).

Biller assosiert med studiet

Pityogenes chalcographus, også kalt liten granbarkbille, er en av de mest vanlige barkbillene på gran i Norge, men de kan også etablere seg i furu (Lekander, et al., 1977). Den er ca. 2 mm lang og er brun med rødaktige dekkvinger. Utviklingstiden til billen tar ca. ett års tid og hovedtiden for svermingen er ofte i mai, men billen kan også fortsette å sverme gjennom hele sommeren. Billen er polygam (Krokene, 2015).

I skoglig betydningen er *P. chalcographus* vanligvis en sekundær art. Den angriper stort sett bare vindfelte eller døende trær (Lekander, et al., 1977; Repe, et al., 2013). *Pityogenes chalcographus* kan imidlertid angripe yngre trær. Dermed er uryddede tynningsflater et godt utgangspunkt for spredning av arten. Toppen av trær som er under angrep av andre barkbiller er også et aktuelt mål for *P. chalcographus* (Göthlin, et al., 2000; Krokene, 2015).

Polygraphus poligraphus, også kalt dobbeltøyet barkbille, er vanlig i Norden og etablerer seg i gran og kan forekomme på furu (Lekander, et al., 1977). Billen kan bli opp til 3 mm lang og er mørkebrun med tydelig lyse skjell på brystet og på dekkvingene. Øynene er nyreformet og har en antenne som går tvers over dem (derav navnet dobbeltøyet). Den har en utviklingstid på ett år og er polygam. Billen er ikke kjent for å drepe levende trær men heller tretopper og trær som er svekket av vær og vind (Lekander, et al., 1977). Ved store tørkeperioder blir trærne ofte utsatt for et stort tørkestress og under dette er det stor sannsynlighet for at de blir angrepet av denne arten (Krokene, et al., 2007; Repe, et al., 2013; Krokene, 2015).

Tomicus piniperda eller stor margborer, er en veldig vanlig plage på furu i Europa, Nord-Afrika og Asia (Masuya, et al., 1998; Jacobs, et al., 2004; Kim, et al., 2005). Den er 3-4mm lang og har brune ben og følehorn mens kroppen er svart. Det er en monogam bille. Morgangene er ca. 8-10 cm lange og kan minne veldig om en «golfkølle» i utseende.



Figur 1. Morgangen til *T. piniperda*, "golfkølle". (Foto: Ruben A. Lindseth)

Utviklingstiden tar ett år og billen forlater som regel treet tidlig på våren (Krokene, 2015).

Tomicus piniperda går som oftest på døde eller svekkede trær (Masuya, et al., 1998; Kim, et al., 2005), og kan ofte angripe trær sammen med *T. minor* (Solheim, et al., 2001). *Tomicus piniperda* kan også angripe unge trær (Kim, et al., 2005) og tar næringsgnag på furukroner (Krokene, 2015), som dermed kan endre vekstvilkårene til disse både i volum og lengde (Solheim, et al., 1993; Krokene, 2015). Dermed er den en viktig årsak til påvirkningen av den økonomiske fortjenesten på furu (Solheim, et al., 2001).

Assosierte sopper

Barkbiller som angriper trær er kjent for å være assosiert med mange ulike sopper (Kirisits, 2004). Mange av disse soppene gir veden en blålig misfarging og kalles derfor blåvedsopper. Noen av dem er i stand til å drepe levende trær (Masuya, et al., 1998). Dette klarer de ved å stoppe vanntransporten opp i trærne slik at de tørker ut og dør (Repe, et al., 2013). Sporene til soppene blir transportert med billen ved å sette seg i mycangia (mest vanlig hos ambrosia biller), i naturlige hulrom på hode og kropp (Furniss, et al., 1990) eller ligger i magen på billen (Krokene & Solheim, 1998; Solheim, et al., 2001). En av kanskje de viktigste årsakene til at sporene fester seg på billen er at de produserer en slimete masse som fungerer som lim (Furniss, et al., 1990). Selv om soppene bruker billene både utvendig og innvendig til å flytte seg fra tre til tre er de ikke parasitter på billen, de fleste av dem lever i symbiose med billene og hjelper til under angrep på trær ved at de bryter ned forsvarssystemet (Solheim, et al., 1993). Samtidig er de også en viktig næring for larver (Repe, et al., 2013; Jankowiak, et al., 2014). Når soppene blir med billene inn i treet får de en stor fordel ved at de kommer inn i steril ved i forhold til andre konkurrerende sopper (Jankowiak, et al., 2014).

Soppene i ordenene *Microascales* og *Ophiomotomatales* er kjent for å være tilpasset spredning med insekter (Solheim & Hietala, 2015). Noen av soppene i disse ordenene er svært patogene, så de er utmerket til å infisere trær og drepe friske levende trær (Krokene & Solheim, 1998). Soppene i disse to ordenene blir nå kalt ophiostomatoide sopper (Solheim & Hietala, 2015), og de er veldig kjent for å være assosiert med barkbiller (Zhou, et al., 2004; Massoumi Alamouti, et al., 2007; Linnakoski, et al., 2008; Repe, et al., 2013; Jankowiak, et al., 2014). At de kalles ophiostomatoide sopper skyldes at de fleste av dem var gruppert i en slekt, *Ophiostoma* Syd. Molekylære metoder har de senere årene gitt bedre oppløsning og nå er de inndelt i mange slekter, hvor de mest kjente er *Ophiostoma*, *Grosmannia* Goid (som inneholder det anamorfe stadiet av *Leptographium* Lagerb & Melin) og *Ceratocystis* Ellis & Halst (Solheim & Hietala, 2015). Andre slekter som også har blitt en del av ophiostomatoide sopper er *Ceratocystiopsis* H.P. Upadhyay & W.B. Kendr og andre aseksuelle sopper i slektene, *Pesotum* J.L. Crane & Schokn, *Hyalorhinocladiella* H.P. Upadhyay & W.B. Kendr., *Sporothrix* Hektoen & C.F. Perkins og *Thielaviopsis* Went, Meded. Disse slektene er de man oftest kaller blåvedsopper, fordi de skaper misfarging i yteveden (Kirisits, 2004) og de lever ofte i symbiose med barkbiller (Repe, et al., 2013; Jankowiak, et al., 2014). Mange sopper fra slekten *Ophiostoma* er vanlig å finne på barkbiller, det er også mange arter derfra som kan spre dødelige sykdommer som er fatale mot trær (Linnakoski, et al., 2008). Som nevnt tidligere var det vanlig at soppsporene ble med billene inn i sterilt trevirke, men det er ikke alle sopparter som har egenskapen til å overleve i ferskt vev av et angrepet tre. Her kommer de aggressive ophiostomatoide artene inn (f.eks. *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier og *Leptographium wageneri* (W.B. Kendr.) M.J. Wingf), det er disse som har muligheten til å spre store sykdommer (Jankowiak, et al., 2014). *Ips typographus* er en barkbille som er assosiert med mange sopper, blant annet *Ophiostoma penicillatum* (Grosmann) Siemaszko, som er blitt så å si konstant assosiert med billen (Solheim, 1993; Solheim, 1992). Fra Solheim (1992) ble det nevnt at Käärik (1975) anslo at *Ophiostoma piceae* (Münch) og *O. penicillatum* var de første soppene som kolonisererte seg i grantrær i Norge ved hjelp av *I. typographus* (Solheim, 1992).

Tomicus piniperda er en vanlig barkbille å finne på furu og er assosiert med mange blåvedsopper, blant annet *Ophiostoma minus* (Hedgc.) og *Leptographium wingfieldii* Morelet (Solheim & Långström, 1991; Masuya, et al., 1998; Jacobs, et al., 2004). Disse soppene er patogene så de kan hjelpe barkbillen å ta livet av trær (Långström, et al., 1993; Jacobs, et al., 2004).

Også enkelte andre soppselekter kan være assosiert med barkbiller. Disse er ikke like mye forsket på da de ikke utgjør noen trussel mot økonomien i skogen. *Geosmithia* er en av disse. Arter innen denne slekta er vanlig på *T. piniperda*, *T. minor*, *Hylurgops palliatus* (Gyllenhal, 1813), *Dryocoetes autographus* (Ratzburg, 1837), *Ips sexdentatus* (Börner, 1766), *P. chalcographus*, *P. poligraphus*, *Trypodendron lineatum* (Olivier, 1795) og *I. typographus* (Jankowiak, et al., 2014).

Selve hensikten med denne undersøkelsen er å studere hvilke sopper som er assosiert med *Pityogenes chalcographus*, *Polygraphus poligraphus* og *Tomicus piniperda*. Her ble det lagt mest vekt på de ophiostomatoide soppene, men det ble også tatt hensyn til enkelte andre sopper.

Metode og materiale

Ved å undersøke de tre ulike billene man har tatt for seg i dette studiet ble det samlet inn barkbiller og blåved, og deretter isolert prøver ut fra disse. De største delene av materialet er samlet inn fra sørlige kommuner i Norge. Disse kommunene er Engerdal, Trysil, Rendalen, Flesberg, Nannestad og Ås. Trysil-, Engerdal og Rendalen kommune ligger i Hedmark fylke, hvor Trysil grenser mot Sverige i øst, mot Rendalen i nordøst og Engerdal i nord. Flesberg er en kommune som ligger i Buskerud fylke og grenser til bykommunen Kongsberg i sør. Nannestad- og Ås kommuner ligger i Akershus fylke. Det ble også samlet inn materiale fra Alta kommune i Finnmark fylke.

I oppgaven er det foretatt en kjønnsfordeling for *P. chalcographus*. For *T. piniperda* er det bare tatt prøver av ved da billene hadde forlatt trevirke ved innsamlingstidspunktet. For *P. poligraphus* er det tatt prøver uavhengig av kjønn. Fra *P. chalcographus* og *P. poligraphus* ble det isolert fra billene samlet både på gran og furu, mens det bare ble isolert fra veden under gangsystemene for *T. piniperda*.

Innsamling av materiale

Innsamlingen av materiale foregikk ved at man tok med seg treprøver hvor det var fastslått at det var angrep av barkbiller. I laboratoriet ble barken forsiktig fjernet og billene ble puttet på små tuber og lagt i fryser for oppbevaring. Etter et par dager ble billene artsbestemt under lupe ved hjelp av å studere forskjellige artstrekk som karakteriserer de ulike billene. Disse trekkene ble funnet i en bok for artsbestemmelse (Pfeffer, 1995). Fra prøver hvor det ble

funnet gangsystemer etter *T. piniperda* ble det tatt ut vedbiter rett under ganger helt inn til kjerneved/marg.

Isolering og rendyrking av sopp

For isolering og rendyrking av sopp ble det laget et vekstmedium (maltagar) som bestod av 6,25 g Malt (Beckton, Dickinson, USA), 10 g Agar og 0,5 l Destillert vann. Når disse var blandet sammen ble de autoklavert i 20 minutter ved 121°C (TOMY SS-325, Tomy Seiko Co. Ltd, Tokyo, Japan). Nå ble det flytende vekstmediumet tømt over i petriskåler (Heger AS, Rjukan, Norway) der det skulle stå og stivne.

Når vekstmediumet var stivnet kunne man begynne å isolere sopp fra billene-/treprøvene.

Biller

Soppisolering fra billene foregikk ved å dele hver enkelt bille i 3 deler, hvor hver del ble lagt i en egen skål med vekstmedium. I denne oppgaven var de tre ulike delene: 1-Hode og nakke, 2- Dekkvinger, 3-Resten av kroppen. Hensikten med dette var at de ulike delene av billene kunne inneholde ulike sporer fra ulike sopper. Når de ulike delene var plassert i en skål ble den «teipet» igjen av litt folie og lagt til siden, slik at man kunne gå tilbake til skålen ved senere tid for å rendyrke. Skålene skulle nå ligge et par dager slik at de ulike soppene fikk tid til å vokse frem.

Rendyrkingen gikk ut på å isolere de ulike soppene som vokste frem av delene i skålene. Det ble tatt en liten bit av en soppkoloni og lagt i en ny skål med vekstmedium, som deretter ble lagt til siden. Her var det viktig å være nøye på at man bare fikk med seg en type sopp i isoleringen, ellers måtte man rendyrke nok en gang fra den nye skålen.

Treprøver

Soppisolering fra treprøvene foregikk ved å kappe til en trekantformet trebit som man skulle dele inn i 3 deler. I denne oppgaven var disse punktene: 1-Øverst på prøven, 2- Midt på prøven (avhengig av hvor langt blåveden strakk seg), 3-Ved enden av blåveden. Siden blåveden ikke går i kjerneveden var det ofte at det var i overgangen mellom yteved og kjerneved at punkt 3 ble satt. Nå ble hvert punkt skåret av prøven etter tur og mellom hvert kutt så tok man ut en liten prøve (treflis: 3*3mm) midt i kappet som man la i en skål. Disse prøvene ble så lagt til siden og rendyrket etter et par dager.

Etter rendyrkingen ble alle soppene gruppert etter det morfologiske utseende. Deretter ble det tatt ut stikkprøver fra hver gruppe som skulle DNA-isoleres. Dette ble gjort på både billene og treprøvene.

DNA- ekstraksjon

Isolering av DNA fra soppens soppmycel ble gjennomført gjennom en 3 dagers prosess. Pipettene og pipettespissene som ble brukt i gjennomgangen hadde blitt produsert av eppendorf. Blanding av ulike kjemikalier ble gjennomført ved å holde tubene mot en vortex (*Vortex-GENIE 2*) (Scientific industries, Inc., Bohemia, NY).

For å isolere DNAet brukte man et sett av kjemikalier og fulgte en modifisert protokoll som het Protocol #8 Isolation of DNA from Mouse Tails (Easy-DNA Kit; Invitrogen, San Diego, CA). Der startet man med å tilsette ca. 0,3 g Fluka sand (Sjøsand, purum, Fluka; Switzerland) i 24 2 ml tuber. Deretter ble en bit av soppmycelet lagt i hver tube sammen med 100 µl av en mix som bestod av reagensene Solution A (20 µl), Solution B (10 µl), Buffer TE (320 µl) og Proteinase K (1,5 µl) eller Protein Degradar (5 µl). Nå ble soppmycelet knust i sanden ved hjelp av stikker man klemte ned i tubene, disse stikkene stod i ExitusPlus (middel som destruerer DNA) for å forhindre kontaminering mellom forskjellige prøver. Stikkene ble vasket i destillert vann og tørket i papir før de ble brukt i tubene. Når soppmycelet var knust i flere mindre biter ble det tilsatt en siste del av kjemikaliemiksen beskrevet øverst (255 µl), for så å blande innholdet rikelig ved å riste dem i en vortex. Til slutt ble blandingen satt i en proteinovn (HT INFORS, Bottmingen, Switzerland) på 60°C og risting på 200 rpm. Der stod prøvene i 12-20 timer.

Neste dag ble det tilsatt en ny dose med Solution A (300 µl) og B (120 µl) og ristet rikelig etterpå. Prøvene ble deretter satt inn i et avtrekkskap (hindrer inhalering av ulike gasser/stoffer) der det skulle tilsettes 750 µl kloroform. Kloroformen tok vekk alt fra løsningen i tubene som ikke var DNA. Tubene ble ristet slik at kloroformen ble blandet med løsningen, deretter ble de kjørt i en sentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415R: Eppendorf, Hamburg, Deutschland) på 16100 rcf i 10 minutter på 4°C. Når sentrifugeringen var ferdig hadde det laget seg et skille i tuben, hvor det øverste laget (som man skulle ha) inneholdt DNA, mens det nederste var avfallsstoff. Det DNA-inneholdende laget ble overført med en pipette til nye tuber på 1,5 mL. Det var veldig viktig og ikke få med noe av skilleveggen i de gamle tubene til de nye.

Etter overføringen ble DNAet pellettert med å tilsette 1 mL med 100 % etanol i hver tube og man inkuberte dem i is i 30 minutter. Deretter ble de kjørt i 10 minutter i sentrifugen (16100 rcf), hvor DNAet dannet seg en liten pellet nederst i tuben. Denne pelleten kunne være alt fra brun til gjennomsiktig og det var veldig viktig og ikke miste den under den resterende renselsesprosessen. Når sentrifugingen var ferdig ble etanolen fjernet fra tubene og det ble tilsatt 500 µl 80 % etanol. Grunnen til at man tilsatte dette var at 80 % etanol fordamper raskere enn 100 % under lufttørring (kommer senere i prosessen). Tubene ble snudd opp ned et par ganger for å få blandet etanolen og kjørt i 3-5 minutter i sentrifugen. Etanolen ble fjernet fra tubene ved hjelp av en pipette (være oppmerksom på ikke å få med pelleten), og kjørt i sentrifugen i 1-3 minutter for å få ned den siste delen av etanolen. Den siste delen av etanolen ble fjernet ved bruk av en pipette og tubene ble satt for å lufttørke i en sterilbenk i 5-15 minutter for å fjerne den resterende etanolen. Tubene ble tilsatt 50 µl med TE buffer for å løse DNAet.

Amplifisering av DNA

Nå skulle prøvene gjøres klare til en PCR (polymerase chain reaction, på norsk polymerasekjedereaksjon), som er en metode for å formere arvestoffet, altså DNAet. Metoden er en rask måte å lage kopier av bestemte DNA-sekvenser i store mengder (Store Medisinske leksikon, 2014). Før prøvene ble kjørt i en PCR skulle de blandes med ulike reagenser, så derfor laget man en reaksjonsmiks fra HotStarTaq 2006 (Qiagen, Hilden, Germany). For hver prøve bestod miksen av 5 µl 10xPCR Buffer, 2 µl MgCl₂, 1 µl dNTP (10 µl av hver), 5 µl BSA (0,4 %), 5 µl TMACl (0,1 mM), 1 µl forward primer ITS1- F (10 µl), 1 µl reverse primer ITS4 (10 µl), 0,4 µl Hot Star Taq + og 27,6 µl Nuclease free water (5 Prime GmbH, Hilden, Germany).

ITS1-F (Gardes & Bruns 1993) og ITS4 (White, et al., 1990) er et sett med primere som brukes til å lage kopier av et artsspesifikt område i ribosomal DNA (Manter & Vivanco, 2007).

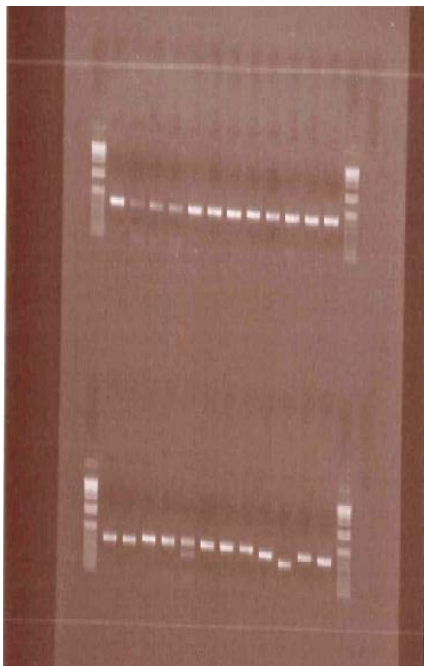
Når miksen var blandet ble det tatt frem 3 PCR- strips (24 små tuber) som det ble tilsatt 48 µl av miksen i og 2 µl av DNAet fra hver av prøvene. Nå ble PCR-stripsene satt inn i en GeneAmp PCR System 9700 hvor de skulle gå gjennom PCR sykluser. Disse syklusene ble startet med et trinn på 95°C i 5 min etterfulgt av 35 sykluser på 30 sek på 95°C (DNA denaturering), 30 sek på 53°C (binding av primere til templatene) og 1 min på 72°C

(syntetisering av mål-DNA), og en avsluttende syklus på 72°C i 10 min før den gikk ned til 4°C og ble værende der til stoppet.

Det ble også kjørt to andre prosesser med bruk av primerne Bt2a og Bt2b (Glass & Donalds 1995) for å lage kopier av β T-regionen (β -tubulin) og primerne EF1F og EF2R (Jacobs, et al., 2004) for å lage kopier av EF-1a (the elongation factor 1-a). Her brukte man ellers samme PCR parametere som i amplifisering av ribosomal DNA, men for binding av primere til templaten brukte man 56°C.

PCR test

På den siste dagen begynte man med å lage en gel der PCR produktene skulle visualiseres. Gelen ble laget ved å blande 1,2 gram agarose med 120 mL TAE buffer, så ble dette koket i ca. 2,45 min i en mikrobølgeovn. Mens vesken blandet seg i mikrobølgeovnen laget man ferdig en form med to kammer slik at når gelen hadde stivnet ble det 28 brønner (hull). Nå ble blandingen satt på risting i en plattform til temperaturen i blandingen hadde sunket ned til rundt 60°C, da ble det tilsatt 12 μ l etidiumbromid i blandingen. Når blandingen var ferdig tømte man denne over i formen, slik at alle kammene ble dekket. Dette skulle nå stå i 20 minutter for å stivne. I mellomtiden begynte man å forberede PCR produktene. Man fjernet nå PCR-stripsene fra maskinen og sentrifugerte dem kort, deretter hentet man 3 nye PCR-strips hvor man tilsatte 1,1 μ l 6xLoading Dye og 5 μ l DNA (PCR produkter) i hver av tubene. Når dette var gjort og gelen var ferdig la man den i et elektroforesekar (Bio-rad Subcell GT horizontal electrophoresis gel apparatus, BIO-Rad, Laboratoties Inc., Hercules, CA), som var fylt med TAE. Nå ble kammene fjernet, og det ble tilsatt 7,5 μ l Laddermix i brønnene på endene av gelen. I brønnene mellom tilsatte man 5 μ l av blandingen av PCR produkter og Loading Dye. Det ble lagt et lokk over elektroforeseket og PCR produktene ble kjørt på 80 volt i 30 min. Ved slutten av ventetiden slo man av strømmen og tok opp gelen, som man la i et Syngene skap som DNA kan visualiseres i UV lys. Her fikk man se om PCR var vellykket eller ikke (figur 2).



Figur 2. Visualisering av PCR produkt etter elektroforese. Foto: Ruben A. Lindseth)

PCR produkt rensing

Etter PCR og elektroforese ble PCR produkter fra vellykkede reaksjoner renset. Det ble brukt 2 ulike måter å rense PCR produktet på i dette studiet.

1. Her brukte man et sett med kjemikalier og fulgte en modifisert protokoll som het MinElute PCR Purification Kit Protocol. Rensingen begynte med å tilsette 200 μ l buffer PBI til 40 μ l av PCR produkter, deretter tømte man blandingene over i hver sin 2 ml MinElute tube. Tubene ble plassert i en sentrifuge (16100 rcf) og kjørt i ett minutt i romtemperatur. Disse tubene inneholdt et filter som DNAet festet seg til under sentrifugeringen. Vesken som hadde gått gjennom filteret ble tømt ut og tubene kastet. Filtrene ble plassert i rene 2 ml tuber og ble tilført 750 μ l Buffer PE som fungert som vaskemiddel. Tubene ble igjen kjørt ett minutt i sentrifugen og vesken ble kastet, men denne gangen byttet man ikke tuber. Man kjørte de samme tubene i sentrifugen nok en gang på ett minutt og etterpå ble filtrene lagt i rene 1,5ml tuber og plassert i en sterilbenk i 20 minutter for å tørke. For å frigjøre DNAet fra filtrene ble det tilsatt 15 μ l Buffer EB midt i filtrene. Bufferen fikk så å stå og trekke i ett minutt før alle tubene ble kjørt ett minutt i sentrifugering. Filtrene ble kastet etterpå og DNAet lå i bunnen på tubene. Det siste steget i ekstraksjonen var å tilsette 5 μ l av primerne ITS1-F og ITS4 i 24 hver sin 1,5 ml tuber og deretter tilsatte man 5 μ l av hvert renset PCR produkt i de to ulike primer tubene.

- Her fulgte man en protokoll som het Rapid PCR Cleanup Enzyme Set (New England Biolabs and Boehringer, Mannheim). Det begynte med at man tilsatte 5 µl fra hvert enzym i settet (Exonuclease I og Shrimp Alkaline phosphatase) rett i PCR produktet. Deretter ble det inkubert i 37°C i 5 minutter for så å bli inkubert i nøyaktig 10 minutter på 80°C. Deretter tilsatte man 5 µl av primerne i 24 hver sin 1,5 ml tube og deretter tilsatte man 5 µl av hvert DNA i de to ulike primer tubene.

Prøvene ble nå ID markert og fryst ned til 80°C til de ble sendt til GATC-Biotech i Tyskland for sekvensering.

DNA sekvensanalyse

Analyse av DNA sekvens ble gjennomført ved å kjøre de mottatte ITS-sekvensene i CLC Main Workbench (CLC Bio©, Denmark), som er et program for å sette sammen og for å sammenligne de ulike nukleinsyrene som primerne har forsterket. I dette studiet var det hovedsakelig ITS1-F og ITS4.

Artsbestemmelsen ble gjort ved å kjøre ITS-sekvensen i en DNA database (GenBank) via et nettprogram som het Standard Nucleotide BLAST, som finnes på <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Her ble ITS-sekvensen søkt opp i databasen og sammenlignet med andre sekvenser. Ved treff fikk man opp en liste av arter og deres likhet med testsekvensen (se Tabell 2).

Resultater

Til sammen ble det isolert 185 prøver i dette studiet (Tabell 1). Av disse var 135 fra barkbiller mens de resterende 50 var fra treprøver.

Tabell 1. Oversikt over antall barkbiller og treprøver som ble brukt i studiet og hvor de ble hentet fra. *Pityogenes chalcographus* har en kjønnsfordeling som leses slik: Antall biller (Hann/Hunn).

Biller/Treprøver	Ullensaker	Flesberg	Ås	Alta	Engerdal	Rendalen	Trysil	Totalt
<i>P.chalcographus</i> (Hann/Hunn)	18 (7/11)	20 (10/10)	-	-	-	19 (9/10)	19 (9/10)	76 (35/41)
<i>P.poligraphus</i>	29	-	30	-	-	-	-	59
<i>T.piniperda</i>	-	-	-	20	10	10	10	50
Totalt	47	19	30	20	10	30	29	185

Artsfordelingen ble 76 prøver av *P. chalcographus*, 59 prøver av *P. poligraphus* og 50 av *T. piniperda*. Kjønnsfordelingen på *P. chalcographus* ble 35 hannbiller og 41 hunnbiller og alle treprøvene kom fra *T. piniperda*.

Under sekvenseringene gav ikke alle sekvensene brukbare resultater i Standard Nucleotide BLAST. Dette skyldes at primerne som ble brukt ikke ga tydelige nok sekvenser. Resultatene er basert på sekvenser ut fra primerne ITS og β T. Siden EF-primeren ikke fungerte og ga dårlige resultater ble denne oversett.

Det var veldig varierende resultater på hvor bra sekvensene kunne gi svar på om det var en bestemt art. I tabell 2 ser man oversikten til de beste matchene i GenBank. Her var det tydelig at ved bruk av andre regioner fikk man bedre identitet for enkelte arter. Et greit eksempel på dett er *O. brunneo-ciliatum* Math.-Käärik, som fikk 100 % match ved bruk av β -tubulin regionen (β T).

Tabell 2. Oversikt over beste ITS-match til hver art i GenBank.

Art	Isolat	Nærmeste match i GenBank	GenBank no.ITS	Identitet (%)
<i>Graphilbum</i> sp.1 ^a	2015-262/3/3	<i>Ophiostoma cf. rectangulosporium</i>	EU785449	99 %
<i>Graphilbum</i> sp.2 ^a	2015-299/2/2	<i>Ophiostoma cf. rectangulosporium</i>	JX444644	99 %
<i>Grosmannia penicillata</i>	2015-163/1/1	<i>Grosmannia penicillata</i>	KF748118	99 %
<i>Grosmannia piceiperda</i>	2015-169/2/2	<i>Grosmannia piceaperda</i>	HE866704	100 %
<i>Leptographium chlamydatum</i> ^b	2015-169/2/1	<i>Leptographium chlamydatum</i>	JF280028	100 %
<i>Ophiostoma bicolor</i>	2015-227/2/1	<i>Ophiostoma bicolor</i>	HE866712	99 %
<i>Ophiostoma brunneo-ciliatum</i> ^b	2015-320/1/1	<i>Ophiostoma brunneo-ciliatum</i>	HM031558	100 %
<i>Grosmannia cucullata</i>	2015-221/1/1	<i>Ophiostoma cucullatum</i>	AJ538335	99 %
<i>Ophiostoma floccosum</i>	2015-319/3/2	<i>Ophiostoma floccosum</i>	AF493237	99 %
<i>Ophiostoma fuscum</i>	2015-127/1/1	<i>Ophiostoma fuscum</i>	HM031504	99 %
<i>Ophiostoma minus</i>	2015-326/2/1	<i>Ophiostoma minus</i>	JQ292827	99 %
<i>Ophiostoma piceae</i>	2015-220/3/1	<i>Ophiostoma piceae</i>	JX444656	99 %
<i>Ophiostoma</i> sp. 1 ^c	2015-128/3/1	<i>Ambrosiella</i> sp.	DQ268583	96 %
<i>Ophiostoma</i> sp. 2 ^c	2015-137/3/1	<i>Ambrosiella</i> sp.	DQ268583	95 %

^a Sekvens sendt til Wilhelm de Beer som mente at det var en ubeskrevet *Graphilbum* art. ^b Best match for β -tubulin sekvens. ^c Nyere studier viser at de fleste artene som tidligere ble kalt *Ambrosiella* nå skal plasseres i *Ophiostoma sensu stricto* (De Beer & Wingfield, 2013).

Soppene som ikke ble artsbestemte, fikk bare slektsnavn (eks: *Graphilbum* sp). Dermed er det enkelte sopper som ble isolert som bare har slektsnavnet. Noen ITS-sekvenser som ga samme slektsnavn under BLAST var svært ulik de andre i samme slekt. Disse ble dermed fordelt inn i to ulike grupper, eks. *Graphilbum* sp. 1 og *Graphilbum* sp.2.

I arten *Grosmannia piceiperda* er det flere isolater som ikke her helt morfologisk like. Disse skulle vært delt inn i ulike arter og fordelt ut fra hvilken kommune og art de kommer fra. Men de er fremvist som et kompleks i dette studiet.

Det var et vidt arts mangfold av ophiostomatoide sopper som ble isolert fra billene og treprøvene. Hele 14 ophiostomatoide sopparter og 19 andre arter ble isolert i dette studiet. Tre av disse skilte seg veldig ut i antall fra resten. Disse var *G. piceiperda*, *Leptographium chlamydatum* K. Jacobs, M.J. Wingf. & H. Solheim og *O. minus* som så å si hadde dobbelt så mange isolater som resten.

Variasjonen på antall sopparter som ble isolert fra en bille/treprøve var stor. For eksempel var det enkelte som hadde bare en sopp mens andre hadde opptil fire ulike sopper med seg.

Pityogenes chalcographus

Siden kjønnsfordelingen ikke ga noen konkrete forskjeller så det ble ikke undersøkt noe nærmere på dette.

De ulike ophiostomatoide soppene som ble isolert fra *P. chalcographus* er vist i tabell 3. Den viser at det er lite med sammenheng mellom hvilke sopper som følger billen inn i både gran og furu på de ulike lokalitetene.

Tabell 3. Antall biller og frekvens av isolerte ophiostomatoide sopper fra *P. chalcographus* fra kommunene Nannestad, Flesberg, Trysil og Rendalen, fordelt på gran og furu.

	Gran		Furu		
Ophiostomatoide sopper	Nannestad	Flesberg	Trysil	Rendalen	Totalt
<i>Graphilbum</i> sp. 2	1 (5,6)	5 (26,3)	7 (36,8)	2 (10)	15 (19,7)
<i>Grosmannia penicillata</i>	6 (33,3)	0	1 (5,3)	0	7 (9,2)
<i>Grosmannia piceiperda</i> -kompleks	3 (16,7)	0	0	3 (15)	6 (7,9)
<i>Leptographium chlamydatum</i>	12 (66,7)	0	5 (26,3)	10 (50)	27 (35,5)
<i>Ophiostoma bicolor</i>	4 (22,2)	0	0	4 (20)	8 (10,5)
<i>Ophiostoma fuscum</i>	8 (44,4)	4 (21,1)	6 (31,6)	3 (15)	21 (27,6)
<i>Ophiostoma minus</i>	1 (5,6)	0	1 (5,3)	8 (40)	10 (13,2)
<i>Ophiostoma</i> sp 1	10 (55,6)	0	0	0	10 (13,2)
Antall biller:	18	19	19	20	76

I Nannestad var *Ophiostoma*-arter mest vanlig, etterfulgt av *Grosmannia*-arter. I Flesberg ble det bare isolert to arter, *Graphilbum* sp.2 og *Ophiostoma fuscum* Linnakoski, Z.W. de Beer M.J. Wingf. Disse to var også de mest vanlige i Trysil, men i tillegg ble artene *O. minus* og *Leptographium chlamydatum* isolert derfra. I Rendalen var det *L. chlamydatum* og *O. minus* som var de vanligste men det var også innslag fra andre *Grosmannia*- og *Ophiostoma* arter samt en art fra slekten *Graphilbum*. De mest vanlige artene var *L. chlamydatum*, *O. fuscum* og *Graphilbum* sp.2 som ble isolert fra 35,5 %, 27,6 % og 19,7 % av alle biller.

I tabell 4 ser man hvilke andre sopper som ble isolert fra *P. chalcographus*. Her var det stort sett i gran at det var med andre typer sopp.

Tabell 4. Antall biller og frekvens av isolerte andre sopper fra *P. chalcographus* fra kommunene Nannestad, Flesberg, Trysil og Rendalen, fordelt på gran og furu.

	Gran		Furu		
Andre sopper	Nannestad	Flesberg	Trysil	Rendalen	Totalt
<i>Davidiella</i> sp.	0	1 (5,3)	0	0	1 (1,3)
<i>Epicoccum nigrum</i>	1 (5,6)	0	0	0	1 (1,3)
<i>Geosmithia</i> sp.1	0	0	0	1 (5)	1 (1,3)
<i>Heterobasidion parviporum</i>	0	1 (5,3)	0	0	1 (1,3)
<i>Lecytophora hoffmannii</i>	0	1 (5,3)	0	0	1 (1,3)
<i>Saccharomycopsis</i> sp.	4 (22,2)	3 (15,8)	0	0	7 (9,2)
<i>Orbilia auricolor</i>	0	1 (5,3)	0	0	1 (1,3)
Antall biller:	18	19	19	20	76

Bare en sopp ble isolert fra furu, *Geosmithia* sp.1 og den ble kun isolert fra Rendalen. Blant alle soppene var det ikke mange biller som ble isolert med samme art. Det var bare fra slekten *Saccharomycopsis* at det ble isolert mer enn en 1. De fleste av de andre artene ble funnet i Flesberg kommune. Disse bestod av *Heterobasidion parviporum*, *Lecytophora hoffmannii*, *Orbilia auricolor* og arter fra slekten *Davidiella*. *Epicoccum nigrum* ble bare isolert fra en bille fra Nannestad.

Polygraphus poligraphus

De ulike ophiostomatoide soppene som ble isolert fra *P. poligraphus* var stort sett bare fra slektene *Ophiostoma* og *Grosmannia* (Tabell 5).

Tabell 5. Antall biller og frekvens av isolerte ophiostomatoide sopper fra *P. poligraphus* fra kommunene Ås og Nannestad.

	Gran		
Ophiostomatoide sopper	Ås	Nannestad	Totalt
<i>Grosmannia penicillata</i>	2 (6,7)	7 (24,1)	9 (15,3)
<i>Grosmannia piceiperda</i> - kompleks	20 (66,7)	11 (37,9)	31 (52,5)
<i>Leptographium chlamydatum</i>	2 (6,7)	6 (20,7)	8 (13,6)
<i>Ophiostoma bicolor</i>	4 (13,3)	2 (6,9)	6 (10,2)
<i>Grosmannia cucullata</i>	1 (3,3)	0	1 (1,7)
<i>Ophiostoma minus</i>	1 (3,3)	1 (3,5)	2 (3,4)
<i>Ophiostoma piceae</i>	2 (6,7)	4 (13,8)	6 (10,2)
<i>Ophiostoma</i> sp. 2	1 (3,3)	0	1 (1,7)
Antall biller:	30	29	59

Soppen som det ble isolert mest av fra *P. poligraphus* var *Grosmannia piceiperda* (Rumbold) Goid som utgjorde 52,5 % av alle billene, det var også den som ble mest isolert fra begge kommunene.

Resten av artene, som bestod av *Grosmannia penicillata* (Grosmann) Goid, *L. chlamydatum*, *Ophiostoma bicolor* R.W. Davidson & D.E. Wells, *Grosmannia cucullatum* H. Solheim, *O. minus*, *O. piceae* og *Ophiostoma* sp. 2 hadde veldig lave innslag. Hvor frekvensen på billene varierte mellom 1-15 %.

Det ble isolert tre andre sopper fra *P. poligraphus* (Tabell 6). Disse soppene var *Hypocrea rufa*, *Mucor hiemalis* og en fra slekten *Penicillium*, hvor de fleste av isolatene kom fra billene fra Nannestad.

Tabell 6. Antall biller og frekvens av isolerte andre sopper fra *P. poligraphus* fra kommunene Ås og Nannestad.

	Gran		
Andre sopper	Ås	Nannestad	Totalt
<i>Hypocrea rufa</i>	1 (3,3)	3 (10,3)	4 (6,8)
<i>Mucor hiemalis</i>	0	3 (10,3)	3 (5,1)
<i>Penicillium</i> sp.	1 (3,3)	0	1 (1,7)
Antall biller:	30	29	59

Tomicus piniperda

De ulike ophiostomatoide soppene som ble isolert fra veden under gangsystemet til *T. piniperda* ser man i tabell 7.

Tabell 7. Antall gangsystemer og frekvens av isolerte ophiostomatoide sopper fra *T. piniperda* fra kommunene Alta, Rendalen, Trysil og Engerdal.

	Furu				
Ophiostomatoide sopper	Alta	Rendalen	Trysil	Engerdal	Totalt
<i>Graphilbum</i> sp. 1	3 (15)	4 (40)	0	0	7 (14)
<i>Grosmannia piceiperda</i> -kompleks	0	1 (10)	1 (10)	0	2 (4)
<i>Leptographium chlamydatum</i>	0	1 (20)	0	0	1 (2)
<i>Ophiostoma brunneo-ciliatum</i>	0	1 (20)	0	0	1 (2)
<i>Ophiostoma floccosum</i>	0	1 (10)	0	0	1 (2)
<i>Ophiostoma minus</i>	18 (90)	8 (80)	6 (50)	10 (100)	42 (84)
Antall biller:	20	10	10	10	50

Den aller vanligste arten var *O. minus* som ble isolert fra 84 % av alle billene. Den var også den eneste soppene som ble isolert fra alle områdene. Dermed var det veldig tydelig at det er *O. minus* som var den mest vanlige soppene å isolere fra *T. piniperda*. De andre soppene var lite frekvente; *Ophiostoma floccosum* Math, *G. piceiperda* og *L. chlamydatum*, *Ophiostoma brunneo-ciliatum* og *Graphilbum* sp. 1.

Det ble isolert mange andre sopparter fra *T. piniperda* (Tabell 8). Selv om antall isoleringer av artene fra disse var nokså liten.

Tabell 8. Antall gangsystemer og frekvens av isolerte andre sopper fra *T. piniperda* fra kommunene Alta, Rendalen, Trysil og Engerdal.

Andre sopper	Furu				Totalt
	Alta	Rendalen	Trysil	Engerdal	
<i>Beauveria bassiana</i>	0	1 (10)	0	0	1 (2)
<i>Chondrostereum purpureum</i>	0	0	1 (10)	0	1 (2)
<i>Cylindrobasidium laeve</i>	2 (10)	0	0	0	2 (4)
<i>Nectria cucurbitula</i>	0	0	0	1 (10)	1 (2)
<i>Peniophora pini</i>	1 (5)	1 (10)	2 (20)	0	4 (8)
<i>Pezicula</i> sp.	0	0	1 (10)	0	1 (2)
<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	2 (10)	0	1 (10)	0	3 (6)
<i>Sistotrema brinkmannii</i>	1 (5)	0	0	0	1 (2)
<i>Sordariomycetes</i> sp	1 (5)	0	0	0	1 (2)
Antall biller:	20	10	10	10	50

Av de 15 artene som ble isolerte var ni av disse ikke ophiostomatoide sopper. De fleste ble isolert bare en gang og i en kommune. *Peniophora pini* og *Rhizosphaera kalkhoffii* ble funnet i henholdsvis tre og to kommuner.

Diskusjon

Alle de undersøkte barkbillene er undersøkt tidligere med hensyn til de ophiostomatoide artene både i Norge og andre steder i Europa. De tidligste undersøkelsene brukte morfologiske karakterer i bestemmelse til slekt og art. Nå i senere tid har det blitt brukt mer molekylære metoder som innebærer sekvensering av ITS regionen. Selv om denne sekvenseringen er det moderne grunnlaget for sopprikets taksonomi, er det ikke alle soppgrupper som faller under dette. Dermed har man i de senere årene begynt å sekvensere andre regioner. Ved hjelp av dette får man en bedre oversikt og mye kan bli endret når disse metodene blir brukt for alle de ophiostomatoide soppene og publisert i GenBank (De Beer, et al., 2013).

Ut fra isolatene til barkbillen *P. chalcographus* viste det seg at det var nesten ingen variasjon på ophiostomatoide sopparter som ble isolert fra gran eller furu. Bortsett fra en, som var *Ophiostoma minus*. Av de 10 billene som bar denne arten ble bare en bille fra gran isolert med den. Dette kan tyde på at soppen foretrekker å leve i furu og ikke gran. Soppen ble også isolert fra *P. poligraphus*, men dette var bare fra to biller. En fra Ås og en fra Nannestad, og dette utgjorde bare 3,4 % av alle billene. Ut fra isolatene til treprøvene fra *T. piniperda* stemmer antagelsen om at *O. minus* trives bra i furu. Her viser *O. minus* seg å være på 84 % av alle billene og var arten som ble mest isolert fra alle kommunene. Tidligere studier har

også vist at *T. piniperda* ofte er assosiert med soppen (Solheim & Långström, 1991; Jacobs, et al., 2004). *Polygraphus poligraphus* og *P. chalcographus* er derimot barkbiller som har fått lav tilknytning til soppen (Mathiesen-Kääriik, 1953; Kirisits, 2004).

Tre *Grosmannia* arter ble funnet i dette studiet. Disse var *Grosmannia penicillata*, *G. piceiperda* og *G. cucullata*. *Grosmannia penicillata* er en art som er veldig vanlig assosiert med barkbiller i Europa (Kirisits, 2004) og i Norden (Linnakoski, et al., 2012). Soppen er en mindre patogen art, som ikke kan leve eller angripe levende yteved, men det kan gi nekrose i bark (Krokene & Solheim, 1996). Den er en art som er veldig vanlig sammen med barkbillen *I. typographus* og har blitt funnet i flere studier i Norge (Solheim, 1993; Solheim, 1992) og i resten av Europa (Repe, et al., 2013). *Grosmannia penicillata* ble isolert fra seks biller hos *P. chalcographus* og ni hos *P. poligraphus* i dette studiet. Dette utgjorde bare 7,9 % og 15,3 % av total mengde isolerte biller. Men at soppen ble assosiert med disse to artene stemmer godt med tidligere studier (Jacobs & Wingfield, 2001; Kirisits, 2004), selv om det er gjort forskning der den ikke er blitt assosiert med *P. chalcographus* (Krokene & Solheim, 1996; Repe, et al., 2013). Men siden *P. chalcographus* ofte går inn i trær som er under angrep eller er blitt angrepet av *I. typographus*, er det nok ikke så rart at *P. chalcographus* er funnet med soppen.

Grosmannia piceiperda eller *G. europhioides* ble først beskrevet som egne arter, men ble senere synonymisert. I nyere tid er det funnet ulikheter mellom disse to og at de representerer distinkte arter (De Beer, et al., 2013). De er imidlertid arter innen *G. piceiperda* komplekset, som i disse dager blir nøyere studert av ei japansk forskergruppe (Halvor Solheim, pers. komm.). I dette studiet brukes derfor *G. piceiperda* om artene i komplekset. Ut fra ITS og β -tubulin sekvenseringen er det imidlertid trolig at det er flere arter enn en art i mitt materiale. Soppen er assosiert med aggressive og ikke-aggressive barkbiller. Den er også relativt patogen, så den er i stand til å drepe levende trær (Linnakoski, et al., 2012). Totalt ble det isolert 39 biller med *O. piceiperda*-komplekset i denne oppgaven. Av disse var 2 fra *T. piniperda*, 6 fra *P. chalcographus* og 31 fra *P. poligraphus*. For *P. poligraphus* utgjorde dette 52,5 % av alle billene og det var ingen annen soppart som var i nærheten av antall isolater. Hvorfor *P. chalcographus* og *T. piniperda* ikke fikk mer isolater fra *O. piceiperda* kan være at prøvene ble samlet inn fra andre kommuner enn *P. poligraphus*. For fra tidligere studier har det vist at alle disse barkbillene er kjent for å være assosiert med soppen i Europa (Kirisits, 2004). Men nylige forskninger har derimot ikke funnet *T. piniperda* assosiert med soppen i Norden (Linnakoski, et al., 2012).

Som nevnt tidligere var det flere isolater av arten som ikke var helt morfologisk like. Disse kunne ha blitt gjort et forsøk på å bli sekvensert med andre typer primere, f.eks. prøvd en ny runde med EF- 1 α . Men det er også mulig at siden arter innen komplekset er under studering er ikke sekvensene av disse publisert i GenBank ennå.

Grosmannia cucullata er veldig ofte funnet i assosiasjon med *I. typographus*. Soppen er også funnet på mange andre barkbiller i Norden og er sagt å være den vanligste *Grosmannia* arten på Nordens biller (Linnakoski, et al., 2012). Den ble isolert bare fra en bille *P. poligraphus* i dette studiet. Ingen tidligere forskning har funnet *P. poligraphus* assosiert med soppen, men de to andre billene er stadig funnet assosiert med den (Kirisits, 2004). *Pityogenes chalcographus* er derimot ikke funnet assosiert med denne soppen i Norden (Linnakoski, et al., 2012), men er assosiert med soppen i Slovenia (Repe, et al., 2013). Ser man deretter på *T. piniperda* er saken heller motsatt. Der er soppen funnet assosiert med billen i de nordlige landene som Norge og Finland (Linnakoski, et al., 2012), men ikke lengre syd i Europa (Kirisits, 2004).

Ophiostoma bicolor er en sopp som blir funnet på ulike treslag i Europa og Nord-Amerika. Fra resultatene i dette studiet stemmer dette tanke på at fra *P. chalcographus* ble det isolert fire biller med den fra furu og fire fra gran. *Ophiostoma bicolor* er en art som er veldig vanlig assosiert med den store granbarkbiller (*I. typographus*) i Norge (Krokene & Solheim, 1996; Solheim, 1992). At soppen har blitt isolert fra både *P. chalcographus* og *P. poligraphus* i denne oppgaven samsvarer bra med tidligere forskninger (Krokene & Solheim, 1996; Kirisits, 2004; Repe, et al., 2013).

Ophiostoma fuscum ble nylig beskrevet fra Finland og nærliggende områder i Russland (Linnakoski, et al., 2012). I dette studiet ble den bare isolert fra *P. chalcographus*, der den ble isolert fra alle kommunene og forekom på 27,6 % av alle billene. Den har ikke blitt oppdaget assosiert med *P. poligraphus* eller *T. piniperda* i tidligere undersøkelser, men er assosiert med *P. chalcographus* og *I. typographus* i lave frekvenser i Fennoskandia (Linnakoski, et al., 2012).

Ophiostoma piceae er en av de mest vanligste ophiostomatoide soppene som man finner på barkbiller (Solheim & Hietala, 2015). Den er ikke noe kresen i substratet den utvikler seg i og den blir sett på som en svak patogen sopp (Krokene & Solheim, 1998). At soppen bare ble isolert fra *P. poligraphus* er meget rart siden tidligere studier ikke har vist at den er assosiert med billen i Fennoskandia, men den er vanlig assosiert med *P. chalcographus* og *T. piniperda*

der (Krokene & Solheim, 1996; Linnakoski, et al., 2012). *Polygraphus poligraphus* er derimot assosiert med soppen sør i Europa (Kirisits, 2004).

Ophiostoma floccosum er ofte funnet i gangsystemer til både gran og furu. Den er ikke noe farlig, og blir dermed sett på som mindre patogen (Linnakoski, et al., 2012). Soppen har vært synonymisert med *O. piceae*, men er senere vist å være en egen art (Harrington, et al., 2001; De Beer, et al., 2013). I dette studiet ble soppen isolert fra en treprøve under gangsystemet til *T. piniperda*. Det er flere tidligere undersøkelser som ikke har funnet soppen assosiert med billen (Mathiesen-Käärik, 1953; Masuya, et al., 1999) men i Sverige er den funnet assosiert med *T. piniperda* og flere andre arter (Linnakoski, et al., 2012).

Ophiostoma brunneo-ciliatum ble for første gang oppdaget og assosiert med *Ips sexdentatus* av Mathiesen-Käärik (1953). Det er en art som veldig ofte er assosiert med slekten *Ips* i Norden (Linnakoski, et al., 2012) og ellers i Europa (Kirisits, 2004). Men den har vist seg å være assosiert med både biller fra slektene *Tomicus* og *Pityogenes* i Norden nå i senere tid (Linnakoski, et al., 2012). Den viser seg derimot ikke å være noe særlig assosiert med disse to slektene i Europa, med tanke på at Repe et. al (2013) hadde en undersøkelse på biller assosiert med ophiostomatoide sopper i Slovenia. Der ble det ikke funnet noen sammenheng mellom *P. chalcographus* og soppen. Men det var stor sammenheng mellom *O. brunneo-ciliatum* og *Ips amitinus* (Eichhoff, 1872) (Repe, et al., 2013).

Det kan tenkes at siden *I. sexdentatus* er ganske vanlig i Nord-Norge (Lekander, et al., 1977) så går den på de samme stakkene som *Tomicus* artene. Dermed kan det føre til at soppen er i isoleringer fra veden under *T. piniperda* sine gangsystemer.

Leptographium chlamydatum var den eneste soppen fra slekten *Leptographium* som ble funnet i denne oppgaven. Soppen er vanlig på gran og ble beskrevet i Norge, assosiert med to ulike barkbiller som gjerne foretrekker røtter hos vertstrærne (Jacobs, et al., 2009; Linnakoski, et al., 2012). Den kan enkelt skilles fra andre *Leptographium* arter ved at det dannes tykke klumpete celler i eldre kulturer (Jacobs, et al., 2009). Den ble funnet på alle billene i oppgaven, men var klart dominerende på *P. chalcographus* der den var isolert fra 35,5 % av alle billene. Fra undersøkelser både i Norge og Finland er det bekreftet at soppen er assosiert med flere barkbiller, som inkluderer *P. chalcographus* og *T. piniperda* (Linnakoski, et al., 2012). Det har derimot ikke blitt funnet noe assosiasjon til billen *P. poligraphus*, slik som man har i dette studiet.

To ulike *Graphilbum* arter ble isolert i dette studiet. Disse to artene er trolig ubeskrevne. Hele slekta er under utredning så disse vil i løpe av et års tid bli beskrevet. Isolatene i dette studiet har en sekvens som har passet inn med foreslåtte nye arter som har blitt isolert både i Polen og Kina (Wilhelm de Beer, pers.komm.).

Ambrosiella er en slekt som er knyttet til ambrosiabiller, og som er tilstede i mycangier, små hulrom på barkbillen hvor soppen vokser. Moderne molekylære teknikker har imidlertid vist at de hører hjemme flere steder innen *Ophiostomatales* (De Beer, et al., 2013). Flere norske isolater har vist seg å høre til i *Ophiostoma*-slekta. Dette er arter som blant annet har blitt isolert fra *P. poligraphus* (Krokene & Solheim, 1996; Krokene & Solheim, 1998; Kirisits, 2004) og *T. minor* (Masuya, et al., 1999). Det mangler imidlertid grundige studier innen disse soppene og i dette studiet blir de kalt for *Ophiostoma* sp.1 og *Ophiostoma* sp. 2.

De tidligere undersøkelsene samsvarer ikke med det man har funnet i dette studiet. Her ble soppen bare isolert fra en bille av *P. poligraphus* og 10 av *P. chalcographus*. Hos Kirisits (2004) og Linnakoski et. al (2012) viser det at det ikke er noe tidligere forskning som tyder på at *Ambrosiella* er assosiert med *P. chalcographus*.

Flere råte-, mugg- og gjærsopper ble funnet i dette studiet, spesielt på *T. piniperda*. En grunn til at dette forekom kan være at tømmerstokkene som treprøvene hadde blitt hentet ut fra hadde ligget ute over lengre tid. Slik at råtesoppene har hatt god til å utvikle seg inn i veden og dermed ble de med i treprøvene. Det samme gjelder for billene. De ble hentet inn sent på høsten (oktober/november). Dermed kan flere sopper ha fått tilvekst og det kan ha blitt større sannsynlighet for at billene har blitt utsatt for flere ulike sopparter. Det er også en mulighet at flere av soppene kom med fra der barkbillene har overvintret.

Det ble også isolert sopper som ofte er tilstede i trevirke, et eksempel på disse er *Geosmithia*. Slekten *Geosmithia* er veldig vanlig å finne på kvister av gran og furu, og den er assosiert med flere barkbiller som går på kvister (Jankowiak, et al., 2014). I Polen har Janikowiak et. al (2014) bekreftet at flere sopper fra slekten er assosiert med *P. chalcographus*. Så selv om frekvensen på soppen er liten i dette studiet kan det fortsatt tyde på at resultatet her støtter Janikowiak et. al (2014) sine funn.

Som nevnt tidligere er *P. chalcographus* og *P. poligraphus* to ikke-aggressiv arter som sjelden dreper levende trær. Men selv om de er ikke-aggressiv biller er de fortsatt assosiert med flere ophiostomatoide sopparter, både i Norden (Linnakoski, et al., 2012) og Europa

(Kirisits, 2004). Sopper som er isolert fra *P. chalcographus* i Norden er *Ceratocystiopsis minuta* (Siemaszko) H.P. Upadhyay & W.B. Kendr, *Ceratocystis coerulescens* (Münch) Bakshi, Trans, *C. polonica* (Siemaszko) C. Moreau, *Graphium pycnocephalum* Grosmann, Z, *G. penicillata*, *G. piceiperda*, *Leptographium lundbergii* Lagerb. & Melin, *L. taigensis* Linnakoski, Z.W. de Beer & M.J. Wingf, *L. chlamydatum*, *Ophiostoma saponiodorum* Linnakoski, Z.W. de Beer & M.J. Wingf, *O. tapionis* Linnakoski, Z.W. de Beer & M.J. Wingf, *O. tetropii* Math, *O. canum* (Münch) Syd, *O. bicolor*, *O. brunneo-ciliatum*, *O. floccosum*, *O. fuscum*, *O. minus* og *O. piceae* (Linnakoski, et al., 2012). Disse soppene har blitt assosiert med *P. chalcographus* etter flere undersøkelser der både fruktlegermer i gangsystemene og soppmycel har blitt analysert. I dette studiet ble det bare tatt hensyn til soppmycelet, dermed er det ikke så rart at bare seks av de åtte soppene som ble isolert fra *P. chalcographus* står blant de 19 soppene ovenfor.

Polygraphus poligraphus er assosiert med fem ulike ophiostomatoide sopper fra tidligere studier i Norden. Disse er *Cop. minuta*, *C. polonica*, *G. penicillata*, *G. piceiperda* og *O. bicolor* (Linnakoski, et al., 2012). Av de åtte ophiostomatoide artene som ble funnet på *P. poligraphus* i dette studiet er det tre av dem som er nevnt ovenfor. Hadde derimot *G. piceiperda* komplekset blitt undersøkt nærmere på er det en sannsynlighet for at det hadde blitt oppdaget flere arter.

Hvorfor bare tre av disse ble oppdaget kan være at studiestedene hvor billene ble samlet fra ikke var tilpasset miljøet for enkelte av soppene eller at det var samlet inn materiale fra for få områder og miljøet på områdene var for likt. Men hvorfor *C. polonica* ikke ble oppdaget er veldig rart siden den er vanlig i Norge (Solheim & Hietala, 2015) og en vanlig sopp assosiert med flere ulike barkbiller (Krokene & Solheim, 1996).

Som den eneste billen i studiet som kun lever på furu har *Tomicus piniperda* blitt assosiert med 17 ulike ophiostomatoide sopper i Norden fra tidligere forskninger. Disse er *Cop. minuta*, *Graphium pseudormiticum* M. Mouton & M.J. Wingf, *Grosmannia olivacea* (Math.) Zipfel, Z.W. de Beer & M.J. Wingf, *G. cucullata*, *G. penicillata*, *Hyalorhinocladia tingens* (Lagerb. & Melin) T.C. Harr., *L. chlamydatum*, *L. lundbergii*, *L. wingfieldii*, *O. clavatum* Math., *O. brunneo-ciliatum*, *O. canum*, *O. floccosum*, *O. ips* (Rumbold) Nannf, *O. minus*, *O. piceae*, *O. piliferum* (Fr. : Fr.) Syd (Linnakoski, et al., 2012). Av disse 17 ble bare fire av dem isolert i dette studiet. Hvorfor dette forekommer kan være at det er mange av soppene som ikke klarer ikke å vokse så godt inn i veden men er kanskje tilstede på selve billen eller på

barken. Uten å ha isolert direkte fra billen er det ingen måte å vite dette på. Dette kan være en mulig forklaring til at det var så få ophiostomatoide sopparter fra *T. piniperda* mens det var flere fra de andre. Men forklaringen kan også ligge i at vedprøvene fra *T. piniperda* ble hentet fra Alta, som ligger langt nord og har et tøffere klima enn sørpå, og fra Østerdalen der det kan være veldig kalde og harde vintre.

Soppene som man har isolert med relative høye frekvenser kan man regne med er assosiert med barkbillene, mens de med lave frekvenser er mer tilfeldig medbrakt. Dette kan ha skjedd ved at barkbillene har fått dem fra andre gangsystemer i bark og yteved. Disse gangene blir brukt både av barkbiller og andre insekter. Så sporer fra andre sopper kan fort ha satt seg på barkbillene vi har valgt å undersøke.

Oppsummering

Ved behandling av resultatene ble det tydelig at artsbestemmelsen kunne blitt mye bedre ved bruk av ulike regioner i sekvenseringen.

Av de 14 ulike ophiostomatoide soppene som ble oppdaget i dette studiet var det tre av disse som var felles for alle billene. Disse var *O. minus*, *G. piceiperda* og *L. chlamydatum*.

Fra billen *P. chalcographus* ble det isolert åtte ophiostomatoide sopper. Det var ikke noe spesifikk forskjell på de ophiostomatoide soppene som befant seg på gran eller furu. Av de åtte ophiostomatoide soppene var det tre som skilte seg ut i antall. Disse var *L. chlamydatum*, *O. fuscum* og *Graphilbum* sp. 2, hvor *L. chlamydatum* var den dominerende. Både *L. chlamydatum* og *O. fuscum* er assosierte sopper med billen i Norden, mens *Graphilbum* -arten viste seg å være en ubestemt art som kunne bli artsbestemt om et års tid. Fra tidligere forskninger der det har blitt tatt hensikt på både fruktlegemer og soppmycel har det blitt funnet 19 sopper assosierte med *P. chalcographus* i Norden. Av disse 19 ble seks isolert i denne oppgaven hvor man kun har hatt fokus på soppmycel. Så det er mulig at ved å fokusere både på fruktlegemer og soppmycel får man et videre artsmangfold å isolere fra og får dermed et mer korrekt svar på de ulike artene som følger billen(e).

Fra billen *P. poligraphus* ble det isolert åtte ophiostomatoide sopper. Det var bare en ophiostomatoid sopp som skilte seg ut fra resten, *G. piceiperda*. I dette studiet ble det isolert flere arter under navnet *G. piceiperda* og *G. europhioides* og ble dermed lagt under et kompleks som ble kalt *G. piceiperda* kompleks. Dette komplekset skulle egentlig ha vært

sekvensert med ulike regioner for å få bestemt de ulike artene. Dermed kunne man ha artsbestemt flere sopper og kommet frem til mer korrekte antall. Av de åtte soppene fra *P. poligraphus* var det bare tre av disse som har blitt assosiert med billen i Norden fra tidligere forskninger. Men enkelte av de isolerte artene er assosiert med billen i Europa.

Av vedprøvene fra *T. piniperda* ble det funnet seks ulike ophiostomatoide sopper. Det var en av de ophiostomatoide soppene klart dominerende, *O. minus*. Denne soppen har blitt funnet assosiert med *T. piniperda* i flere undersøkelser både i Europa og Norden. Tidligere forskninger har vist at 17 sopper er assosiert med soppen i Norden. I dette studiet ble det funnet fire av dem. Grunnen til at det ikke ble isolert flere kan tenkes at mange av soppene sitter på billen eller i barken og vokser ikke så bra i veden. Dermed bør videre forskning innen denne arten foregå både direkte fra billen og fra veden. Slik at man får undersøkt begge vektorene for soppen.

Alle de andre soppene som ble oppdaget i studiet hadde lave frekvenser og virket mer tilfeldig på billene. Det er muligheter at de kom pga. at materialet ble hentet inn sent på året, slik at disse soppene fikk utvikle seg og spre sporer. Dermed blir det mer riktig å samle inn materialet tidligere på året, slik at man får soppene som er der i nylig angrepet ved.

Resultatene fra isolatene i denne oppgaven har vist seg å være både bekreftede og varierende fra hva tidligere undersøkelser har sagt. Tar man for seg hver barkbille er det noen sopper som man nesten kan garantere er assosiert med hver av dem. Ta f. eks *T. piniperda* og soppen *O. minus*. Her er isolatene av soppen høy i forhold til de andre artene og flere tidligere undersøkelser støtter at de er assosierte. Så man kan si at soppen er assosiert med billen i Norge. Det samme gjelder for *P. chalcographus* med soppen *L. chlamydatum*, og *P. poligraphus* med soppen *G. piceiperda*.

Men som nevnt er det enkelte ophiostomatoide sopper som har vist seg å variere fra hva andre har funnet ut. På disse kan man på ikke noen måte si at de er assosiert med billene. Det er heller nødvendig for større og lengre undersøkelser skal det bli bekreftet at de faktisk er assosierte med billen(e).

I videre arbeid ville jeg anbefale at det fokuseres mer på å bruke flere ulike regioner under sekvenseringen, siden de fungerte så ulikt på de forskjellige soppartene. Vil også anbefale å ta analyser av miljø og klima fra innsamlingspunktene slik at man kan begrunne hvor enkelte sopparter vokser eller ikke.

Referanser

- De Beer, W., Seifert, K. & Wingfield, M., 2013. A nomenclator for ophiostomatoid genera and species in the Ophiostomatales and Microascales. *Biodiversity series*, Volum 12, pp. 245-322.
- De Beer, Z. W. & Wingfield, M. J., 2013. Emerging lineages in the Ophiostomatales. I: K. A. Seifert, Z. W. De Beer & M. J. Wingfield, red. *The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers*. Utrech: CBS Press, pp. 21-46.
- Furniss, M. M., Solheim, H. & Christiansen, E., 1990. Transmission of blue-stain fungi by *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) in Norway spruce. *Annals of the Entomological Society of America*, 83(4), pp. 712-716.
- Göthlin, E., Schroeder, L. M. & Lindelöw, A., 2000. Attacks by *Ips typographus* and *Pityogenes chalcographus* on Windthrown Spruces (*Picea abies*) During the Two Years Following a. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 05 November, pp. 542-549.
- Harrington, T., McNew, D., Steimel, J., Hofstra, D. & Farrell, R., 2001. Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch Elm Disease fungi. *Mycologia*, Volum 93, pp. 111-136.
- Jacobs, K., Bergdahl, D., Wingfield, J., Halik, S., Seifert, K., Bright, D. & Wingfield, B., 2004. *Leptographium wingfieldii* introduced into North America and found associated with exotic *Tomicus piniperda* and native bark beetles. *Mycological Research*, 108(4), pp. 411-418.
- Jacobs, K., Krokene, P., Solheim, H. & Wingfield, M. J., 2009. Two new species of *Leptographium* from *Dryocetes autographus* and *Hylastes cunicularius* in Norway. *Mycological Progress*, 9(1), pp. 69-78.
- Jacobs, K., Solheim, H., Wingfield, B. D. & Wingfield, M. J., 2005. Taxonomic re-evaluation of *Leptographium lundbergii* based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycological Research*, 109(10), pp. 1149-1161.
- Jacobs, K. & Wingfield, M. J., 2001. *Leptographium species: Tree Pathogens, Insect Associates, and Agents of Ble-stain*. St.Paul, Minnesota: APS Press.

- Jankowiak, R., Kolarík, M. & Bilanski, P., 2014. Association of Geosmithia fungi (Ascomycota: Hypocreales) with pine- and spruce-infesting bark beetles in Poland. *Fungal Ecology*, 6 Juni, Volum 11, pp. 71-79.
- Kim, J.-J., Lim, Y., Breuil, C., Wingfield, M., Zhou, X. & Kim, G.-H., 2005. A new Leptographium species associated with Tomicus piniperda infesting pine logs in Korea. *Mycological Research*, 109(3), pp. 275-284.
- Kirisits, T., 2004. Fungal Associates Of European Bark Beetles With Special Emphasis On The Ophiostomatoid Fungi. I: F. Lieutier, et al. red. *Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, A Synthesis*. Wien: Kluwer Academic Publishers, pp. 181- 236.
- Kolarík, M., Freeland, E., Utley, C. & Tisserat, N., 2010. Geosmithia morbida sp. nov., a new phytopathogenic species living in symbiosis with the walnut twig beetle (Pityophthorus juglandis) on Juglans in USA. *Mycologia*, 103(2), pp. 325-332.
- Kolarík, M., Kostavčík, M. & Pazoutová, S., 2007. Host range and diversity of the genus Geosmithia (Ascomycota: Hypocreales) living in association with bark beetles in the Mediterranean area. *Mycological research*, 111(11), pp. 1298 - 1310.
- Krokene, P., 1996. *The role of blue stain fungi in tree killing by bark beetles*. Oslo: Ås Trykk AS.
- Krokene, P., 2015. *Skogskade på Internett : Barkbiller*. [Internett]
Available at:
<http://skogskade.skogoglandskap.no/index.cfm?oa=diagnosis.view&men=31&dia=730>
[Funnet 11 April 2015].
- Krokene, P., 2015. *Skogskade på Internett : Dobbeltøyet barkbille*. [Internett]
Available at: <http://skogskade.skogoglandskap.no/index.cfm?oa=diagnosis.view&dia=701>
[Funnet 18 Februar 2015].
- Krokene, P., 2015. *Skogskade på Internett : Liten granbarkbille*. [Internett]
Available at:
<http://skogskade.skogoglandskap.no/index.cfm?oa=diagnosis.view&men=31&dia=550>
[Funnet 27 Februar 2015].

Krokene, P., 2015. *Skogskade på Internett : Stor margborer*. [Internett]

Available at:

<http://skogskade.skogoglandskap.no/index.cfm?oa=diagnosis.view&men=31&dia=144>

[Funnet 2 April 2015].

Krokene, P. & Solheim, H., 1996. Fungal associates of five bark beetle species colonizing Norway spruce. *Canadian Journal of Forest Research*, 26(12), pp. 2115-2122.

Krokene, P. & Solheim, H., 1998. Pathogenicity of Four Blue-Stain Fungi Associated with Aggressive and Nonaggressive Bark Beetles. *Phytopathology*, 88(1), pp. 39-44.

Krokene, P., Økland, B. & Christiansen, E., 2007. *Skog og landskap*. [Internett]

Available at: http://www.skogoglandskap.no/filearchive/krokene_fra_v-2007-3.pdf

[Funnet 18 Februar 2015].

Lekander, B., Bejer-Petersen, B., Kangas, E. & Bakke, A., 1977. The distribution of bark beetles in the Nordic Countries. *Acta Entomologica Fennica*, Issue 32, p. 37.

Linnakoski, R., De Beer, Z., Niemelä, P. & Wingfield, M., 2012. Associations of Conifer-Infesting Bark Beetles and Fungi in Fennoscandia. *Insects*, 3(4), pp. 200-227.

Linnakoski, R., De Beer, Z.W., Rousi, M., Niemelä, P., Pappinen, A. & Wingfield, M., 2008. Fungi, including *Ophiostoma karelicum* sp. nov., associated with *Scolytus ratzeburgi* infesting birch in Finland and Russia.. *Mycological research*, 112(12), pp. 1475-1488.

Långström, B., Solheim, H., Hellqvist, C. & Gref, R., 1993. Effects of pruning young Scots pines on host vigour and susceptibility to *Leptographium wingfieldii* and *Ophiostoma minus*, two blue-stain fungi associated with *Tomicus piniperda*.. *European J Forest Pathology*, 23(6-7), pp. 400-415.

Manter, D. K. & Vivanco, J. M., 2007. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of microbiological methods*, 71(1), pp. 7-14.

Massoumi Alamouti, S., Kim, J.-J., Humble, L., Uzunoviz, A. & Breuil, C., 2007.

Ophiostomatoid fungi associated with the northern spruce engraver, *Ips perturbatus*, in western Canada.. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92(1), pp. 19-34.

- Masuya, H., Kaneko, S. & Yamaoka, Y., 1998. Blue Stain Fungi Associated with *Tomicus piniperda* (Coleoptera : Scolytidae) on Japanese Red Pine. *Journal of Forest Research*, Volum 9, pp. 213-219.
- Masuya, H., Kaneko, S., Yamaoka, Y. & Osawa, M., 1999. Comparisons of Ophiostomatoid Fungi Associated with *Tomicus piniperda* and *T. minor* in Japanese Red Pine. *Journal of Forest Research*, Volum 4, pp. 131-135.
- Mathiesen-Kääriik, A., 1953. En översikt av de vanligsta med barkborrar förenade blåytesvamparna i Sverige och några för Sverige nye blåytesvampar. *Meddelanden, Statens skogsförkningsinstitut*, Volum 43, pp. 1-74.
- Pfeffer, A., 1995. *Zentral- und westpaläarktische Borken- und Kernkäfer (Coleoptera: Scolytidae, Platypodidae)*. Basel: Pro Entomologia c/o Naturhistorisches Museum.
- Raffa, K. F., Grégoire, J.-C. & Lindgren, B., 2015. Natural History and Ecology of Bark Beetles. I: F. E. Vega & R. W. Hofstetter, red. *Bark Beetles: Biology and ecology of native and invasive species*. s.l.:Elsevier Inc, pp. 1-28.
- Repe, A., Kirisits, T., Piškur, B., De Groot, M., Kump, B. & Jurc, M., 2013. Ophiostomatoid fungi associated with three spruce-infesting bark beetles in Slovenia. *Annals of Forest Science*, 26 Juli, 70(7), pp. 717-727.
- Solheim, H., 1992. Fungal succession in sapwood of Norway spruce infested by the bark beetle *Ips typographus*. *European Journal of Plant Pathology*, Volum 22, pp. 136-148.
- Solheim, H., 1992. The early stages of fungal invasion in Norway spruce infested by the bark beetle *Ips typographus*. *Canadian Journal of Botany*, Volum 70, pp. 1-5.
- Solheim, H., 1993. Fungi associated with the spruce bark beetle *Ips typographus* in an endemic area in Norway. *Scandinavian Journal of Forest Research*, Volum 8, pp. 118-122.
- Solheim, H. & Hietala, A. M., 2015. Ophiostomatoid fungi in Norway. *Agarica*, in press..
- Solheim, H., Krokene, P. & Långström, B., 2001. Effects of growth and virulence of associated blue-stain fungi on host colonization behaviour of the pine shoot beetles *Tomicus minor* and *T. piniperda*. *Plant Pathology*, Volum 50, pp. 111-116.

Solheim, H. & Långström, B., 1991. Original article Blue-stain fungi associated with *Tomicus piniperda* in Sweden and preliminary observations on their pathogenicity a a a. *Annales des Sciences Forestières*, 13 November, Volum 48, pp. 149-156.

Solheim, H., Långström, B. & Hellqvist, C., 1993. Pathogenicity of the blue-stain fungi *Leptographium willgfieldii* and *Ophiostoma minus* to Scots pine: effect of tree pruning and inoculum density. *Canadian Journal of Forest Research*, 23(7), pp. 1438-1443.

Store medisinske leksikon, 2014. *Store medisinske leksikon*. [Internett]

Available at: <https://sml.snl.no/PCR>

[Funnet 19 Mars 2015].

Zhou, X., De Beer, W., Cibrian, D. & Wingfield, B. D., 2004. Characterisation of *Ophiostoma* species associated with pine bark beetles from Mexico, including *O. pulvinisporum* sp. nov.. *Mycological research*, 108(6), pp. 690-698.

Figurer/Tabeller

Figur 1. Morgangen til *T. piniperda*, "golfkølle". (Foto: Ruben A. Lindseth)..... 3

Figur 2. Visualisering av PCR produkt etter elektroforese. Foto: Ruben A. Lindseth) 10

Tabell 1. Oversikt over antall barkbiller og treprøver som ble brukt i studiet og hvor de ble hentet fra. *Pityogenes chalcographus* har en kjønnsfordeling som leses slik: Antall biller (Hann/Hunn)..... 11

Tabell 2. Oversikt over beste ITS-match til hver art i GenBank..... 12

Tabell 3. Antall biller og frekvens av isolerte ophiostomatoide sopper fra *P. chalcographus* fra kommunene Nannestad, Flesberg, Trysil og Rendalen, fordelt på gran og furu. 13

Tabell 4. Antall biller og frekvens av isolerte andre sopper fra *P. chalcographus* fra kommunene Nannestad, Flesberg, Trysil og Rendalen, fordelt på gran og furu..... 14

Tabell 5. Antall biller og frekvens av isolerte ophiostomatoide sopper fra *P. poligraphus* fra kommunene Ås og Nannestad..... 14

Tabell 6. Antall biller og frekvens av isolerte andre sopper fra *P. poligraphus* fra kommunene Ås og Nannestad..... 15

Tabell 7. Antall gangsystemer og frekvens av isolerte ophiostomatoide sopper fra <i>T. piniperda</i> fra kommunene Alta, Rendalen, Trysil og Engerdal.....	15
Tabell 8. Antall gangsystemer og frekvens av isolerte andre sopper fra <i>T. piniperda</i> fra kommunene Alta, Rendalen, Trysil og Engerdal.	16



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no