中国东部栗疫病菌 dsRNA 群体的多样性

徐陈贤 刘福秀 周晓云 王克荣*

(南京农业大学植物病理学系, 南京 210095)

摘要: 采用生物学测定和凝胶电泳的方法, 对中国东部栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)的 dsRNA 病毒进行了研究。根据电泳图谱, 中国东部栗疫病菌的 dsRNA 病毒可以分为 5 种类型, 其中类型 I 只具有一个 12.7 kb 的条带, 占大多数; 类型 II 有两条带, 一条 12.7 kb, 另一条 5.2 kb 左右, 只有一个菌株 354; 类型 III 则除了 12.7 kb 的条带外, 还有 3 条小于 2 kb 的小片段, 有 238 和 250 两个菌株; dsRNA 属于类型 IV 的为 269 和 344 两个菌株, 它只含有两个 1.8–3.1 kb 的小片段; dsRNA 类型 V 只有一个菌株 280, 除了一条 12.7 kb 分子外, 还有 4 条 2.6–3.3 kb 的小片段。含有 dsRNA 的菌株培养性状多样, 根据菌落特征, 栗疫病菌可以划分为 5 种培养类型, 但菌株的培养类型与 dsRNA 的类型间没有对应的关系。毒力测定表明含有 dsRNA 病毒的供试菌株大多属于低毒力类型。

关键词: 电泳图谱, dsRNA, 培养性状, 毒力

中图分类号: Q346+.5; S436.64

文献标识码: A

文章编号: 1005–0094(2004)03–0370–07

Diversity of the dsRNA population of *Cryphonectria parasitica* from eastern China

XU Chen-Xian, LIU Fu-Xiu, ZHOU Xiao-Yun, WANG Ke-Rong*

Department of Plant Pathology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

Abstract: Forty-one dsRNA viruses of *Cryphonectria parasitica* isolates from eastern China were divided into five types on the basis of gel electrophoresis patterns. Type I contained only one segment of 12.7 kb, accounting for majority of the dsRNA viruses. Type II had another segment about 5.2 kb besides the segment of 12.7 kb, and was only found in the pathogen isolate 354. Type III possessed the 12.7 kb segment and other three small ones shorter than 2 kb, which was detected from the two isolates 238 and 250. Type IV was separated from pathogen isolates 269 and 344, which contained only two small dsRNA segments about 1.8–3.1 kb. Type V, including four small dsRNA segments about 2.6–3.3 kb and the 12.7 kb one, was only extracted from the isolate 280. The cultural characters of all these tested isolates, whether or not including dsRNA viruses, were diverse and could be also divided into five cultural types. The cultural type of *C. parasitica* isolate is not consistent with the type of dsRNA virus and virulence test results showed that most of the tested isolates containing dsRNA viruses were hypovirulent.

Key words: *Cryphonectria parasitica*, electrophoresis pattern, dsRNA, cultural character, virulence

栗疫病是世界上著名的森林病害之一, 广泛分布于亚洲、欧洲和北美洲, 特别是在北美洲曾造成严重的经济损失(Anagnostakis, 1982)。20 世纪 60 年代中期, 法国真菌学家在意大利北部发现了栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)的低毒力菌株, 它具有将低毒力因子传递给强毒力菌株并使之毒力下降的能力, 因而可用来进行生物防治(Grente, 1965)。意大利和法国利用低毒力菌株防治栗疫病相继获得

了成功, 为栗疫病的防治开辟了新的途径(Anagnostakis, 1988)。但是, 美国利用低毒力菌株防治栗疫病的效果不如上述两国理想, Anagnostakis 认为其主要原因是美国栗疫病菌群体中营养体亲和群比较复杂, 低毒力菌株不能在群体中广泛传播(Anagnostakis & Kranz, 1987)。

中国栗疫病分布广泛, 发生历史悠久, 营养体亲和群更加复杂, 例如江苏、安徽省的栗疫病菌, 在

219 个菌株中就检测到 131 个营养体亲和群(王克荣等,1991),因此采用低毒力菌株进行中国栗疫病的生物防治更加困难。

本研究以中国东部含有 dsRNA 的栗疫病菌为材料,用生物学测定和凝胶电泳的方法对栗疫病菌的 dsRNA 进行研究,目的在于了解 dsRNA 群体的多样性特征及其与寄主病原菌生物学性状多样性的关系。

1 材料方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

参试的 45 个栗疫菌菌株均为南京农业大学植保学院植物病原真菌研究室保存菌株,其中菌株 295、312、G11 和 251 为野生型菌株,不含 dsRNA 病毒,其余 41 个菌株均含有 dsRNA 病毒,207a 菌株为分离自菌株 207 单孢后代中的另一种培养类型。含 dsRNA 的菌株来源和特征见表 1。

1.1.2 培养基

形态观察和菌丝体培养采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和马铃薯葡萄糖培养液(PDB)(方中达,1998)。

1.1.3 dsRNA 提取试剂及其配制

1 × STE[100 mmol NaCl, 50 mmol Tris (pH 8.0), 1 mmol EDTA]; 2 × STE; 洗柱缓冲液(column wash buffer) 500 mL 2 × STE 加入 170 mL 无水乙醇,加水至 1000 mL; 提取缓冲液(extraction buffer)在 2 × STE 中加入 2% 的 SDS,溶解。

1.2 研究方法

1.2.1 培养性状的观测与类型划分

参试菌株在 PDA 平板上培养 5 d 后,用打孔器切取菌落边缘的幼嫩菌丝块(直径为 7 mm),菌丝体朝下置于 PDA 平板中央(培养皿直径 90 mm),置于 25℃、黑暗条件下培养,每个菌株 3 个重复,7 d 后观察并记录结果,根据培养性状将全部供试菌株分类。

1.2.2 毒力测定方法

有 38 个菌株参与毒力测定,测定采用枝段接种方法。取同一品种的板栗(*Castanea mollissima*)树上直径为 2–3 cm 的枝条,剪去侧枝,锯成长约 50 cm 的小段供接种用。清水洗净枝段表面,自然晾干

后,用熔化的石蜡将枝段两端和剪去侧枝的伤口处密封,防止水分散失和污染。70% 酒精进行表面消毒,在枝段上每隔 11 cm 用灭菌的解剖刀划一个“T”形伤口,用消毒镊子将树皮揭开,接入同样大小(直径 7 mm)的菌丝块,菌丝体朝内,盖好树皮,外用透明胶布封牢,防止水分蒸发。每个菌株重复 3 次,分处 3 个不同的枝段上,以中国强毒力菌株 G11 作对照,另外分别以美国低毒力菌株 EP713 和无菌 PDA 琼脂块作低毒力和空白对照。接种后的枝段放入灭菌的密封容器中,用湿纱布保湿,置 25℃ 下黑暗培养。20 d 后测定病斑的长、宽,利用椭圆面积公式($S = \frac{1}{4}\pi ab$, a 、 b 分别为长度和宽度)计算病斑面积和相对毒力。相对毒力的计算公式如下:

$$\text{相对毒力} = \frac{\text{菌株的病斑面积}}{\text{G11 的病斑面积}} \times 100\%$$

按相对毒力的大小分为 3 种毒力类型:相对毒力为 80.0% 以上为强毒力;相对毒力 30.0%–80.0% 为中等毒力;相对毒力在 30.0% 以下为低毒力。

1.2.3 菌体的培养方法

各菌株在 PDA 平板上培养 7 d 后,加入 10 mL 灭菌水,用解剖刀将菌丝体刮下,移入马铃薯葡萄糖培养液中,25℃、150 rpm 振荡培养 4–5 d,灭菌纱布过滤获得菌丝体,冷冻干燥后,将菌丝体研磨成粉末,–20℃ 保存待用。

1.2.4 dsRNA 的提取、纯化与检测

在 30 g 纤维素 CF-11(Whatman 公司产品)中加入 250 mL 洗柱缓冲液,静置使其膨胀,4℃ 下保存备用。装柱高度约为 2 cm,用洗柱缓冲液平衡。将菌丝粉加入 10 mL 提取缓冲液和 8 mL 酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),轻微振荡,3500 rpm 离心 15 min;将上层水相移入刻度试管中,加入无水乙醇至其浓度为 17%,装入层析柱静置,用洗柱缓冲液进行洗脱,洗柱缓冲液全部排空后加入 1 × STE 7 mL,收集流下的液体于刻度试管;在试管中加入洗脱液体积 1/10 的 3 mol/L NaAc 和两倍的无水乙醇,在 4℃ 下 8000 rpm 离心 1 h;用 500 μL H₂O 重悬浮沉淀,加入 50 μL 3 mol/L NaAc 和两倍体积的无水乙醇,12 000 rpm 离心沉淀,70% 酒精洗涤一次,晾干,灭菌双蒸水溶解,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 dsRNA。

表 1 参试的低毒力菌株来源及其寄主
Table 1 Hosts and locations of tested hypovirulent isolates of *Cryphonectria parasitica* from eastern China

菌株编号 Isolate no.	采集地点 Location	寄主植物 Host plant
027	江苏吴县 Wuxian , Jiangsu	板栗 <i>Castanea mollissima</i>
059	江苏宜兴 Yixing , Jiangsu	板栗 <i>C. mollissima</i>
077	江苏宜兴 Yixing , Jiangsu	板栗 <i>C. mollissima</i>
102	江苏吴县 Wuxian , Jiangsu	板栗 <i>C. mollissima</i>
207	福建宁化 Ninghua , Fujian	板栗 <i>C. mollissima</i>
207a(单孢菌株) Single spore isolate of 207	福建宁化 Ninghua , Fujian	板栗 <i>C. mollissima</i>
225	北京怀柔 Huairou , Beijing	板栗 <i>C. mollissima</i>
228	北京怀柔 Huairou , Beijing	板栗 <i>C. mollissima</i>
235	北京怀柔 Huairou , Beijing	板栗 <i>C. mollissima</i>
238	北京怀柔 Huairou , Beijing	板栗 <i>C. mollissima</i>
245	北京怀柔 Huairou , Beijing	板栗 <i>C. mollissima</i>
248	北京怀柔 Huairou , Beijing	板栗 <i>C. mollissima</i>
250	辽宁丹东 Dandong , Liaoning	日本栗 <i>C. crenata</i>
256	辽宁丹东 Dandong , Liaoning	日本栗 <i>C. crenata</i>
266	辽宁丹东 Dandong , Liaoning	日本栗 <i>C. crenata</i>
267	辽宁丹东 Dandong , Liaoning	日本栗 <i>C. crenata</i>
269	辽宁丹东 Dandong , Liaoning	日本栗 <i>C. crenata</i>
271	辽宁丹东 Dandong , Liaoning	日本栗 <i>C. crenata</i>
276	辽宁丹东 Dandong , Liaoning	日本栗 <i>C. crenata</i>
277	辽宁丹东 Dandong , Liaoning	日本栗 <i>C. crenata</i>
280	辽宁丹东 Dandong , Liaoning	日本栗 <i>C. crenata</i>
289	辽宁丹东 Dandong , Liaoning	日本栗 <i>C. crenata</i>
293	山东泰安 Tai'an , Shandong	板栗 <i>C. mollissima</i>
315	山东泰安 Tai'an , Shandong	板栗 <i>C. mollissima</i>
316	山东泰安 Tai'an , Shandong	板栗 <i>C. mollissima</i>
344	湖南郴州 Chenzhou , Hunan	板栗 <i>C. mollissima</i>
354	安徽休宁 Xiuning , Anhui	板栗 <i>C. mollissima</i>
367	江西贵溪 Guixi , Jiangxi	板栗 <i>C. mollissima</i>
372	江西贵溪 Guixi , Jiangxi	板栗 <i>C. mollissima</i>
374	江西贵溪 Guixi , Jiangxi	板栗 <i>C. mollissima</i>
375	江西贵溪 Guixi , Jiangxi	板栗 <i>C. mollissima</i>
376	江西贵溪 Guixi , Jiangxi	板栗 <i>C. mollissima</i>
379	江西贵溪 Guixi , Jiangxi	板栗 <i>C. mollissima</i>
410	浙江金华 Jinhua , Zhejiang	板栗 <i>C. mollissima</i>
413	浙江金华 Jinhua , Zhejiang	板栗 <i>C. mollissima</i>
419	浙江金华 Jinhua , Zhejiang	板栗 <i>C. mollissima</i>
431	浙江金华 Jinhua , Zhejiang	板栗 <i>C. mollissima</i>
503	安徽休宁 Xiuning , Anhui	板栗 <i>C. mollissima</i>
505	安徽休宁 Xiuning , Anhui	板栗 <i>C. mollissima</i>
518	安徽休宁 Xiuning , Anhui	板栗 <i>C. mollissima</i>
544	安徽休宁 Xiuning , Anhui	板栗 <i>C. mollissima</i>

2 结果与分析

2.1 菌株培养类型

与野生型菌株不同 ,含有 dsRNA 的菌株培养特征变化多样(图 1) ,菌株生长速度、色素形成、孢子

产生和气生菌丝形态等都有差别。根据培养性状 ,所有供试菌株分为 5 种主要培养类型 ,其中非野生型菌落的典型特征和代表菌株见表 2。

2.2 毒力测定

部分参试菌株对板栗枝段接种的毒力测定结果

图1 我国东部栗疫病菌的培养特征
类型Ⅰ：G、K；类型Ⅱ：B、L；类型Ⅲ：A、F；类型Ⅳ：C、H、I；类型Ⅴ（野生型）：D、E、J。
A：菌株225；B：菌株207a；C：菌株289；D：菌株295；E：菌株312；F：菌株315；G：菌株207；H：菌株277；I：菌株266；J：菌株251；K：菌株256；L：菌株238。

Fig. 1 Cultural characters of *Cryphonectria parasitica* isolates from eastern China
Type I：G, K; Type II：B, L; Type III：A, F; Type IV：C, H, I; Type V(Wild type)：D, E, J.
A, isolate 225; B, isolate 207a; C, isolate 289; D, isolate 295; E, isolate 312; F, isolate 315; G, isolate 207; H, isolate 277; I, isolate 266; J, isolate 251; K, isolate 256; L, isolate 238.

表2 含病毒栗疫病菌的培养类型、菌落特征及其代表菌株
Table 2 Characters of the cultural type and typical isolate of *Cryphonectria parasitica* with hypovirus

培养类型 Cultural type	菌落特征 Colony character				代表菌株 Typical isolate
	颜色 Color	形态 Shape	生长速度 Growth rate	产孢量 Sporulation	
Ⅰ	淡黄 Bright orange	圆形 Round	快 Quick	中等 Medium	256
	橘黄 Orange	不规则花瓣状 Irregular	慢 Slow	中等 Medium	
Ⅱ	白色 White	圆形 Round	快 Quick	少 Few	225
Ⅳ	白色 White	圆形或不规则 Round or irregular	中等 Medium	少 Few	277

图2 栗疫病菌 dsRNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱
M 为分子量参照物 λ -Hind III；S 为核酸浓度参照物。
从左到右的泳道分别为：M, 027, 059, 077, 102, S, 207, 225, 228, 235, 238, 245, S, 248, 250, 256, 266, 267, 271, S, 276, 277, 280, 289, M, 293, 315, 316, 269, S, 354, 367, 372, 374, 375, 376, S, 379, 410, 413, 419, 431, 344, 503, 505, 518, 544, M, respectively。

Fig. 2 dsRNA electrophoresis patterns of *Cryphonectria parasitica*
M： λ -Hind III；S：concentration marker of nucleic acid.
The lanes from left to right are M, 027, 059, 077, 102, S, 207, 225, 228, 235, 238, 245, S, 248, 250, 256, 266, 267, 271, S, 276, 277, 280, 289, M, 293, 315, 316, 269, S, 354, 367, 372, 374, 375, 376, S, 379, 410, 413, 419, 431, 344, 503, 505, 518, 544, M, respectively.

表 3 部分含 dsRNA 病毒菌株的板栗枝段接种结果
Table 3 Virulence tests of *Cryphonectria parasitica* isolates with hypovirus by excised-stem inoculation

菌株编号 Isolate no.	病斑面积 (cm ²) Lesion area	相对毒力 Relative virulence	毒力类型 Virulence type	菌株编号 Isolate No.	病斑面积 (cm ²) Lesion area	相对毒力 Relative virulence	毒力类型 Virulence type
027	2.7	8.0	低 Low	277	6.9	20.4	低 Low
059	5.1	15.0	低 Low	280	5.1	15.0	低 Low
077	4.8	14.2	低 Low	289	3.8	11.2	低 Low
102	6.7	19.8	低 Low	293	10.1	29.8	低 Low
207	8.4	24.8	低 Low	315	7.3	21.5	低 Low
207a	2.8	8.3	低 Low	344	8.9	26.3	低 Low
225	6.3	18.6	低 Low	354	10.2	30.1	中 Medium
228	5.3	15.6	低 Low	367	9.4	27.7	低 Low
235	2.5	7.4	低 Low	372	8.0	23.6	低 Low
238	6.1	18.0	低 Low	374	3.6	10.6	低 Low
245	2.7	8.0	低 Low	375	15.7	46.3	中 Medium
248	6.9	20.4	低 Low	376	5.3	15.6	低 Low
250	13.0	38.3	中 Medium	379	3.7	10.9	低 Low
256	4.5	13.3	低 Low	410	7.2	21.2	低 Low
266	3.3	9.7	低 Low	413	2.2	6.5	低 Low
267	10.6	31.3	中 Medium	419	6.3	18.6	低 Low
269	4.2	12.4	低 Low	431	6.0	17.7	低 Low
271	8.9	26.3	低 Low	316	5.5	16.2	低 Low
276	4.2	12.4	低 Low	G11	33.9	100.0	强 High

表 4 中国东部栗疫病菌 dsRNA 的类型、特征和代表菌株
Table 4 Characters of dsRNA type and typical isolates of *C. parasitica* from eastern China

类型 dsRNA type	电泳带型 Electrophoresis patterns	代表菌株 Typical isolate
I	1 个片段 ,长度为 12.7 kb One segment of 12.7 kb	102
II	2 个片段 :一条 12.7 kb ,另一条 5.2 kb 左右 Two segments : one 12.7 kb , the other about 5.2 kb	354
III	1 个大片段(12.7 kb)及 3 个小片段(<2 kb) One segment of 12.7 kb and three small segments shorter than 2 kb	250
IV	2 个片段 ,长度为 1.8 – 3.1 kb Two small segments between 1.8 – 3.1 kb	269
V	1 个大片段(12.7 kb)及 4 个小片段(2.6 – 3.3 kb) One segment of 12.7 kb and four small segments between 2.6 – 3.3 kb	280

见表 3。根据毒力测定结果 ,可以将这些菌株对栗枝段的致病力分为 3 种类型 :强毒力、中等毒力和低毒力。毒性菌株在栗枝段上都可形成明显的分生孢子器 ,含有病毒的菌株形成的病斑小 ,并且不产生分生孢子器。

2.3 dsRNA 的检测结果

供试菌株 dsRNA 病毒的琼脂糖凝胶电泳图谱见图 2。从图 2 可以看出 ,大多数 dsRNA 病毒都含有分子量为 12.7 kb 的条带 ,另外在含有该条带的病毒中 ,有的还含有其他一些不同分子量的条带。

根据 dsRNA 的片段数和各片段的分子量大小,将所有的 dsRNA 分为 5 种类型,各类型的特征和代表菌株见表 4。低毒力菌株中只有 269 和 344 号菌株不含有 12.7 kb 分子量的 dsRNA 条带,其余低毒力菌株都有该病毒条带。dsRNA 属于类型 I 的菌株最多,属于类型 III 和类型 IV 的菌株各有 2 个,分别为 238、250 和 269、344;类型 II 和类型 V 的菌株各只有一个 354 和 280。

3 讨论

本研究的 41 个含有 dsRNA 的栗疫病菌株来自中国东部的 19 个省(直辖市),南北纵跨 17 个纬度,其寄主有板栗(*Castanea mollissima*)和日本栗(*C. crenata*)。基本代表了中国东部的不同生态类型和不同栗树种类上的栗疫病病毒(在锥栗上没有采集到含 dsRNA 病毒的菌株),因此所含的 dsRNA 也基本代表了中国东部栗疫病病毒 dsRNA 的类型和分布。

栗疫病菌株间 dsRNA 的片段数目、浓度和分子量大小均有差异(Anagnostakis, 1979; Dodds, 1980; Elliston, 1985)。通过琼脂糖凝胶电泳图谱来反映栗疫病病毒 dsRNA 的特征,是简单而有效的方法。根据电泳图谱,中国东部栗疫病病毒的 dsRNA 可以根据片段数和片段大小分为 5 种类型,但绝大多数低毒力菌株都有 12.7 kb 分子量的病毒条带,这与美国菌株中的病毒类型明显不同(Peever *et al.*, 1997)。

最初在意大利发现的低毒力菌株的菌落都是白色的,后来从欧洲和北美分离到大量的低毒力菌株,它们在菌落形态、颜色、生长速率、产孢能力和致病力方面都显示出一定的变异,这些变异被认为与菌体中含有的 dsRNA 有关(Elliston, 1982; 1985)。中国东部含有 dsRNA 的栗疫病菌株的培养类型表现出丰富的多样性,存在 5 种培养类型,在毒力方面也表现出一定的差异,板栗枝段接种的结果表明相对毒力最低为 6.5%、最高为 46.3%。

研究表明,dsRNA 属于同一种类型的栗疫病菌株在培养性状类型上并不一定相同。如 077、102、266、267 和 277 这 5 个菌株都只含有一条 12.7 kb 的 dsRNA,属于 dsRNA 病毒类型 I,但是它们的培养性状各不相同,分别属于 5 种不同培养类型,毒力水平也有差异。导致这种差异的原因可能是它们所含的 dsRNA 在功能基因序列上有差异,dsRNA 序列的

不同使它对寄主菌株的影响不同,从而产生不同的生物学性状。目前,对于 dsRNA 的分子生物学研究,已经确定了 CHV1-EP713 的碱基序列中影响寄主菌体培养性状和毒力的部分(Suzuki & Nuss, 2002),因此要明确含有同一分子量 dsRNA 的栗疫病菌株却具有不同生物学性状的原因,需要作分子序列水平上的进一步研究。

对于栗疫病病毒 dsRNA 的中、小片段(9 kb 以下),通常认为它们是长片段 dsRNA 内部缺失的结果(Nuss, 1992)。但是,对于美国菌株 GH2 的 dsRNA 的研究表明,它的一个 1 kb 的小片段不能与大片段进行杂交,可能是卫星 RNA (Smart *et al.*, 1999)。dsRNA 的中、小片段一般与大片段同时存在,它们对寄主菌株的作用还不明确,而且也不很稳定,浓度和片段数目会随着培养时间而变化(Nuss, 1992)。

Allemann 等(1999)曾利用 RFLP 标记对来自欧洲 72 个低毒力栗疫病病毒的 dsRNA 进行研究,研究中的所有 dsRNA 虽都属于 CHV1,但却具有遗传多样性,可以分为 5 个亚型。中国东部所有的 dsRNA 基本上都拥有与 CHV1-EP713 相同的 12.7 kb 的片段,属于 CHV1,但是根据其对菌株生物学性状的影响,仍然可以推测它们的基因序列具有丰富的遗传多样性,考虑到中国的栗疫病病毒历史比欧洲悠久,发生遗传分化的几率可能更大。

参考文献

- Allemann, C., Hoegger, P., Heiniger, U. and Rigling, D. 1999. Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology*, **8**: 843–854.
- Anagnostakis, S. L. 1982. Biological control of chestnut blight. *Science*, **215**: 466–471.
- Anagnostakis, S. L. and Kranz, J. 1987. Population dynamics of *Cryphonectria parasitica* in a mixed-hardwood forest in Connecticut. *Phytopathology*, **77**: 751–754.
- Anagnostakis, S. L. 1988. *Cryphonectria parasitica*, cause of chestnut blight. *Advances in Plant Pathology*, **6**: 123–136.
- Anagnostakis, S. L. and Day, P. R. 1979. Hypovirulence conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, **69**: 1226–1229.

- Dodds, J. A. 1980. Revised estimates of the molecular weights of dsRNA segments in hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, **70**: 1217 – 1220.
- Elliston, J. E. 1982. Hypovirulence. *Advances in Plant Pathology*, **1**: 1 – 33.
- Elliston, J. E. 1985. Characterization of dsRNA-free and dsRNA-containing strains of *Endothia parasitica* in relation to hypovirulence. *Phytopathology*, **75**: 151 – 158.
- Fang, Z. D. (方中达). 1998. *Methods in Plant Diseases Research* (植病研究方法). China Agriculture Press, Beijing. (in Chinese)
- Gretné, J. 1965. Les formes hypovirulents d. *Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre le chancre du châtaignier. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie d'Agriculture de France*, **51**: 1033 – 1037.
- Nuss, D. L. 1992. Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiological Reviews*, **56**: 561 – 576.
- Peever, T. L., Liu, Y. C. and Milgroom, M. G. 1997. Diversity of hypoviruses and other double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. *Phytopathology*, **87**: 1026 – 1033.
- Smart, C. D., Yuan, W., Foglia, R., Nuss, D. L., Fulbright, D. W. and Hillman, B. I. 1999. *Cryphonectria hypovirus* 3, a virus species in the family Hypoviridae with a single open reading frame. *Virology*, **265**: 66 – 73.
- Suzuki, N. and Nuss, D. L. 2002. Contribution of protein p40 to hypovirus-mediated modulation of fungal host phenotype and viral RNA accumulation. *Journal of Virology*, **76**: 7747 – 7759.
- Wang, K. R. (王克荣), Shao, J. Y. (邵见阳) and Lu, J. Y. (陆家云). 1991. On vegetative compatibility of *Cryphonectria parasitica* in Jiangsu and Anhui. *Journal of Nanjing Agricultural University* (南京农业大学学报), **14**(4): 44 – 48. (in Chinese with English abstract)

(责任编辑:时意专)