

# 栗疫病菌低毒性病毒(CHV1)分子序列的多态性

刘福秀 丁平 徐陈贤 王克荣\*

(南京农业大学植物病理学系, 南京 210095)

**摘要:** 为了探明欧洲栗疫病菌低毒性病毒(CHV1)病毒的起源, 采用序列测定方法对来自中国、日本和意大利的30个CHV1的遗传多样性进行了分析。测定了所有病毒的部分序列, 根据测序结果可将其分为29个单元型, 分属于3个不同的亚型: 中国菌株的病毒群体归属于亚型 和 ; 日本病毒群体除Ja55属于亚型 外, 其余属于亚型 ; 意大利病毒群体除IT192属于亚型 外, 其余都属于亚型 。中国CHV1病毒群体的地理分布特点为: 亚型 主要分布在长江以北, 其中只有09344(来自湖南)例外; 而亚型 主要分布在长江以南, 但09228(北京)、09235(北京)、09277(辽宁)例外。这不同于欧洲主要以一种亚型为主的情况, 表明各群体之间存在着一定的基因流动。本研究的结果表明中国CHV1病毒群体的遗传多样性比日本群体和意大利群体都丰富。

**关键词:** 栗疫病, 真菌病毒, 双链RNA病毒, RT-PCR

## Polymorphism of nucleotide sequences in *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) from China, Japan, and Italy

Fuxiu Liu, Ping Ding, Chenxian Xu, Kerong Wang\*

Department of Plant Pathology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

**Abstract:** A total of 30 hypovirus isolates (CHV1) of *Cryphonectria parasitica* from China, Japan, and Italy were analyzed by partial nucleotide measurement for ORF A in the virus genome to reveal the origin of CHV1 in Europe. By partial nucleotide measurement, these viruses can be divided into 29 different haplotypes, which group into three subtypes. The viruses from China belong to subtypes and , whereas the viruses from Japan belong to subtype except for Ja55 of subtype , and the viruses from Italy were of subtype except for IT192 belonging to subtype . Subtypes and are widely distributed in China whereas in Europe only one subtype is spread widely. Subtype viruses in southern China are bounded by the Yangtze River except isolates 09228 and 09235 from Beijing and 09277 from Liaoning Province, whereas subtype viruses occurred in northern China except for isolate 09344 from Hunan Province. The results suggest that gene flow occurred among the hypovirus populations and also revealed greater diversity in CHV1 populations from China than in those from Japan and Italy.

**Key words:** chestnut blight, mycovirus, dsRNA virus, RT-PCR

栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)中存在的低毒性病毒及其对栗疫病(chestnut blight)的生防潜力, 引起了很多学者的关注。随着新的低毒性病毒的不断发现, 国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses)于1995年建立了一个新的科——低毒性病毒科(Hypoviridae)(Hillman *et al.*, 1995; Rigling & Hillman,

2000), 这个科目前只有一个属, 即低毒性病毒属(*Hypovirus*), 并依据基因组结构及序列相关性将其进一步分成不同的种。目前已经报道的有4个种, 分别为*Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1)和CHV2、CHV3、CHV4, 其中CHV1病毒包含若干个成员, 如CHV1-EP713(Shapira *et al.*, 1991)、CHV1-Euro7(Chen & Nuss, 1999)、CHV1-EP747

收稿日期: 2004-09-06; 接受日期: 2005-01-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(30370918)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: wkr01@njau.edu.cn

等; 其余3个种都只有一个成员, 分别为CHV2-NB58, CHV3-GH2, CHV4-SR2 (Hillman *et al.*, 1992, 1994)。

栗疫病菌中所含的dsRNA在分子大小、种类及浓度上各不相同(Dodds, 1980)。Peever等(1997)用Northern杂交的方法研究了北美的dsRNA群体, 将其分为3个杂交群(hybridization group), 其中只有一个杂交群是广泛分布的, 其余两个都局限在一个比较小的地理范围内, 所有的dsRNA分子都不能与来自欧洲的CHV1病毒杂交, 也不能与来自美国新泽西的CHV2-NB58杂交。Peever等(1998)用同样的方法研究了中国和日本的dsRNA群体, 发现它们之间没有遗传差异。Allemann等(1999)采用RFLP标记研究了欧洲栗疫病菌dsRNA(均为CHV1病毒)的遗传多样性, 将来自欧洲9个国家的72个栗疫病菌的dsRNA分为5个亚型(subtype): 大多数的dsRNA(64个)属于一个亚型, 另外4个亚型中有2个分布在法国, 1个在西班牙, 1个在德国, 这个结果与研究者们提出的欧洲的低毒性病毒有多种来源的假说一致(Peever *et al.*, 1998)。

Liang等(1994)和全勇等(1994)研究了2个中国栗疫病菌菌株的dsRNA, 发现它们都能与CHV1病毒杂交, 没有发现其他的CHV类型; 但Peever等(1998)在中国的安徽省休宁县发现了3个CHV2型的dsRNA, 它们与来自美国新泽西的CHV2-NB58在1644个核苷酸序列上只相差7个碱基。徐陈贤等(2004)发现中国东部栗疫病菌的dsRNA可使寄主真菌的培养特征发生不同的改变, 其电泳图谱也可分为5种类型。上述结果表明中国栗疫病菌的dsRNA也存在多样性, Liang等(1994)和全勇等(1994)的结果可能是由于样本较少或方法不同的原因。

要阐明*C. parasitica*中dsRNA的起源及其亲缘关系, 就必须了解亚洲特别是中国dsRNA的多样性。本研究采用比较部分核酸序列的方法研究了中国东部地区、日本和意大利栗疫病菌CHV1病毒的多态性, 并比较了各群体之间的关系, 旨在研究中国和日本、意大利CHV1病毒群体各菌株间部分序列的变异情况和多态特征。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

在本实验室收藏的各地栗疫病菌菌株中, 有40多个含有CHV1病毒, 但其中只有30个病毒株可被所采用的特异性引物扩增出cDNA产物, 含该30个病毒的参试菌株特征见表1。同一地点不同菌株的采集点至少相隔200 m。在中国群体中, 除辽宁菌株分离自寄主日本栗(*Castanea crenata*)外, 其余菌株的寄主均为板栗(*C. mollissima*); 日本群体菌株分离自日本栗(*C. crenata*); 意大利群体菌株的寄主为欧洲栗(*C. sativa*)。

### 1.2 cDNA的合成

用Promega公司的随机六聚体引物和反转录酶M-MLV合成cDNA的第一链。在14  $\mu$ L的体系中加入3  $\mu$ L(2  $\mu$ g)dsRNA, 0.5  $\mu$ L(0.25  $\mu$ g)随机引物, 1  $\mu$ L纯度大于99.9%的DMSO(Sigma公司产品), 9.5  $\mu$ L dd H<sub>2</sub>O。混匀后于70  $^{\circ}$ C水浴15 min, 迅速置于冰上3–5 min。加入5  $\mu$ L 5  $\times$  M-MLV反应缓冲液, 5  $\mu$ L dNTP(2.5 mmol/L)和1  $\mu$ L M-MLV。在PCR仪上25  $^{\circ}$ C孵育10 min, 55  $^{\circ}$ C反应50 min, 94  $^{\circ}$ C变性2 min。反应结束后立即进行PCR扩增。

### 1.3 PCR扩增及其产物的回收

根据CHV1-EP713和CHV1-Euro7的保守序列设计引物, 上游引物P4251设计在CHV1-EP713中ULT区的第316–334位, 5'–3'序列为CCTATGGTGAAAACGGATG; 下游引物P4252设计在CHV1-EP713中ORF A区的第724–740位, 5'–3'序列为AGCACGGTCGGCAACTC。上、下游引物之间的长度在CHV1-EP713上为425 bp, 引物由TaKaRa公司合成。50  $\mu$ L的反应体系中加入5  $\mu$ L 10  $\times$  PCR反应缓冲液, 1.5  $\mu$ L cDNA, 2  $\mu$ L dNTP(2.5 mmol/L), 3  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L), 上、下游引物各2  $\mu$ L(2.5  $\mu$ mol/L), 0.5  $\mu$ L(2.5 U) Taq DNA聚合酶(Promega公司产品)和34  $\mu$ L dd H<sub>2</sub>O。在PCR仪上按以下程序扩增: 94  $^{\circ}$ C预变性2 min, 进入循环: 94  $^{\circ}$ C变性45 s, 51  $^{\circ}$ C退火45 s, 72  $^{\circ}$ C延伸1 min, 共30个循环, 最后再72  $^{\circ}$ C延伸7 min。

在对09228、09248、09256、09277、09280、09344、09419、COX007、IT319、Ja89这10个菌株的dsRNA进行RT-PCR时, 为提高产量, 需把退火温度降低到49  $^{\circ}$ C, 其他条件不变。

表1 栗疫病菌供试菌株的来源及其特征

Table 1 Isolates of CHV1-infected *Cryphonectria parasitica* used in this study

菌株编号* Isolate no.*	采集地点 Location	分离时间 Time of isolation	cDNA 长度 cDNA length (bp)
09228	北京市怀柔县 Huairou, Beijing, China	June, 1991	422
09235	北京市怀柔县 Huairou, Beijing, China	June, 1991	422
09248	辽宁省凤城县 Fengcheng, Liaoning Province, China	June, 1991	426
09256	辽宁省凤城县 Fengcheng, Liaoning Province, China	June, 1991	426
09271	辽宁省东沟县 Donggou, Liaoning Province, China	June, 1991	426
09277	辽宁省东沟县 Donggou, Liaoning Province, China	June, 1991	422
09280	辽宁省东沟县 Donggou, Liaoning Province, China	June, 1991	426
09293	山东省泰安市 Tai'an, Shandong Province, China	June, 1991	426
09344	湖南省郴州市 Chenzhou, Hunan Province, China	Mar., 1992	427
09367	江西鹰潭市 Yingtan, Jiangxi Province, China	Mar., 1992	422
09379	江西鹰潭市 Yingtan, Jiangxi Province, China	Mar., 1992	422
09419	浙江省金华县 Jinhua, Zhejiang Province, China	Mar., 1992	422
2411	江西鹰潭市 Yingtan, Jiangxi Province, China	Sept., 2001	421
F32	江西鹰潭市 Yingtan, Jiangxi Province, China	Nov., 2002	422
G05	江西鹰潭市 Yingtan, Jiangxi Province, China	Nov., 2002	422
CHR011	湖北武汉市 Wuhan, Hubei Province, China	Dec., 2000	426
COX007	湖北武汉市 Wuhan, Hubei Province, China	Dec., 2000	426
IT192	意大利 Bergamo, Italy	Nov., 1993	426
IT254	意大利 Bergamo, Italy	Nov., 1993	423
IT319	意大利 Bergamo, Italy	Nov., 1993.	423
IT344	意大利 Bergamo, Italy	Nov., 1993	423
IT370	意大利 Bergamo, Italy	Nov., 1993	423
Ja07	日本 Ibaraki, Japan	Oct., 1992	422
Ja16	日本 Ibaraki, Japan	Oct., 1992	422
Ja19	日本 Ibaraki, Japan	Oct., 1992	422
Ja28	日本 Ibaraki, Japan	Oct., 1992	421
Ja55	日本 Ibaraki, Japan	Oct., 1992	423
Ja58	日本 Ibaraki, Japan	Oct., 1992	422
Ja67	日本 Ibaraki, Japan	Oct., 1992	422
Ja89	日本 Ibaraki, Japan	Oct., 1992	422

\*均用纤维素粉 CF11 柱层析法提取各菌株 dsRNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 都只有一个大小为 12.7 kb 的片段, Marker 是 *-Hind*。  
\* dsRNA were detected by cellulose CF11 chromatography. All isolates contain only one fragment of 12.7 kb according to the *-Hind* Digest DNA Marker.

PCR产物用1%的琼脂糖凝胶上样200  $\mu$ L电泳, 加DNA Marker DL2000检测产物质量, 把约425 bp的条带切下, 用TaKaRa公司的琼脂糖凝胶DNA纯化试剂盒回收纯化。纯化过程按TaKaRa公司提供的说明书进行, 最后一步加20  $\mu$ L dd H<sub>2</sub>O洗脱DNA, 用1.4%的琼脂糖凝胶上样3  $\mu$ L电泳, 加DNA Marker DL2000检测回收效果。

#### 1.4 序列测定

将不同地区来源的共30个含有dsRNA病毒的代表性菌株的RT-PCR回收产物克隆到测序专用载体PMD18-T Vector(TaKaRa公司产品)上, 操作

过程按TaKaRa公司提供的说明书进行。宿主菌使用JM109, 采用*EcoR*和*Hind* (均为TaKaRa公司产品)双酶切鉴定连接和转化结果。20  $\mu$ L酶切体系中加入2  $\mu$ L(约0.5  $\mu$ g)纯化的质粒, *EcoR* 0.5  $\mu$ L, *Hind* 0.5  $\mu$ L, 2  $\mu$ L 10  $\times$  M缓冲液, 15  $\mu$ L dd H<sub>2</sub>O。37  $^{\circ}$ C 酶切2 h。全部的酶切产物用1.2%的琼脂糖凝胶电泳, 加DNA Marker DL2000检测酶切效果。将克隆到测序专用载体PMD18-T Vector(TaKaRa公司产品)上的dsRNA病毒的RT-PCR回收产物各取一个克隆送TaKaRa公司(大连)进行测序。

1.5 数据分析

各病毒株序列之间的比较(alignment)采用生物软件BioEdit version 4.8.2(Hall, 1999)进行分析, 根据病毒株间序列碱基异同数目采用生物软件Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) version 3.0聚类分析软件(Kumar *et al.*, 2001)处理, 以UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)软件对病毒株间序列碱基异同数目的数据进行遗传距离计算和聚类分析。

2 结果

所有病毒株的RT-PCR产物经电泳检测, 结果都只有一条约425 bp的DNA带。

2.1 各病毒cDNA的序列测定

测定了各病毒株RT-PCR回收产物的cDNA序列, 加上引物序列, 各病毒cDNA片段的碱基数见表1。各菌株的病毒之间碱基差异的数目从0到142个不等(表2), 只有Ja19与Ja58没有差异, 属于同一个单元型, 相似性达100%; 而Ja55与09280、09293的cDNA序列间都存在142个碱基差异, 相似性只有66.43%。

2.2 序列同源性分析

供试病毒cDNA扩增产物的系统关系见图1, 据各病毒株的序列同源性把30个病毒株划分为3个亚型, 即亚型I、II、III。亚型I包括09248、09256、09271、09280、09293、09344、CHR011、COX007、IT192共9个病毒株; 亚型II包括Ja07、Ja16、Ja19、Ja28、Ja58、Ja67、Ja89共7个病毒IT344、IT370、Ja55共14个病毒株。中国群体的病毒株归属于亚型I和II; 日本的病毒株除Ja55属于亚型II外, 其余均属于亚型I; 意大利的病毒株除IT192属于亚型II外, 其余都属于亚型I。

亚型I内的病毒扩增产物cDNA间的碱基差

异数目为2-32个, 变异率为0.47%-7.51%; 亚型II内的病毒扩增产物cDNA间的碱基差异数目为2-47个, 变异率为0.47%-11.11%; 亚型III内的病毒扩增产物cDNA间的碱基差异数目为0-11个, 变异率为0-3.08%。亚型I与亚型II之间碱基差异数目为118-130, 变异率为27.96%-30.81%, 亚型II与亚型III之间碱基差异数目为23-54, 变异率为5.45%-12.53%, 亚型I与亚型III之间碱基差异数目为113-142, 变异率为26.53%-33.57% (表2)。

中国栗疫病菌CHV1病毒的地理分布有一定的特点: 亚型I主要分布在长江以北, 亚型II主要分布在长江以南。意大利的IT192与中国的北方群体相似, 其他病毒株则与中国的南方群体相似; 而日本的Ja55与日本其他病毒株不同, 却与中国的南方病毒群体相似。中国的北方群体(亚型I)中09344是湖南的, 而南方群体(亚型II)中也有来自北方的病毒株: 09228和09235(北京)、09277(辽宁)。

2.3 群体间的遗传多样性比较

中国南方群体、中国北方群体、日本群体和意大利群体的遗传距离见表3。中国北方群体与日本群体间的遗传距离最远, 达0.398, 而中国南方群体与日本群体间的遗传距离最近, 只有0.087; 中国南方群体与中国北方群体间的遗传距离是0.165; 亚型I包括09228、09235、09277、2411、09367、09379、09419、G05、F32、IT254、IT319、0.384, 仅次于北方群体与日本群体间; 意大利群体与中国南方群体、日本群体、中国北方群体间的遗传距离分别为0.165、0.167、0.352。各病毒群体根据遗传距离得出的UPGMA聚类图见图2。意大利群体与中国南方群体和日本群体间的遗传距离都明显小于它与中国北方群体间的遗传距

表2 CHV1病毒亚型内及亚型间碱基差异数和同源性  
Table 2 Nucleotide number differences and homology within and between CHV1 subtypes

亚型 Subtype	亚型I		亚型II		亚型III		病毒株数 No. of isolates
	碱基差异数目 No. of nt differences	同源性 Homology(%)	碱基差异数目 No. of nt differences	同源性 Homology(%)	碱基差异数目 No. of nt differences	同源性 Homology(%)	
	2-32	92.49-99.53	118-130	69.19-72.04	113-142	66.43-73.47	9
			2-47	88.89-99.53	23-54	87.47-94.55	7
					0-11	96.92-100	14

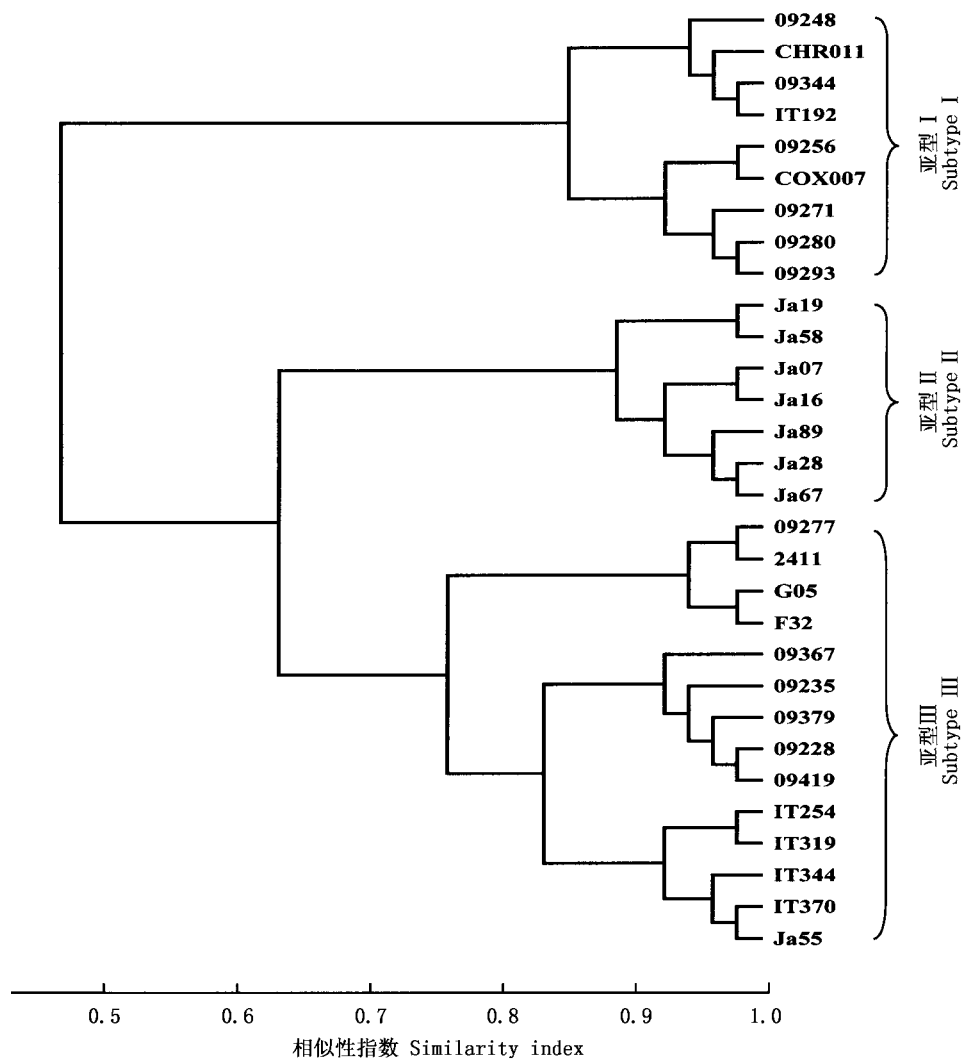


图1 栗疫病菌低毒性病毒株间的系统关系(依据ORF A的部分核苷酸序列)

Fig. 1 Phenogram of genetic similarities among *Cryphonectria hypovirus* 1 isolates based on a partial nucleotide sequence from ORF A

表3 不同地区CHV1病毒群体间的遗传距离

Table 3 Genetic distances among CHV1 populations at regional level

地区 Region	中国北方 Northern China	中国南方 Southern China	日本 Japan	意大利 Italy
中国北方 Northern China	***			
中国南方 Southern China	0.384	***		
日本 Japan	0.398	0.087	***	
意大利 Italy	0.352	0.165	0.167	***

离, 表明意大利CHV1病毒可能起源于中国南方或日本, 可以肯定不是中国的北方。

### 3 讨论

含有低毒性病毒的供试菌株的核酸通过纤维

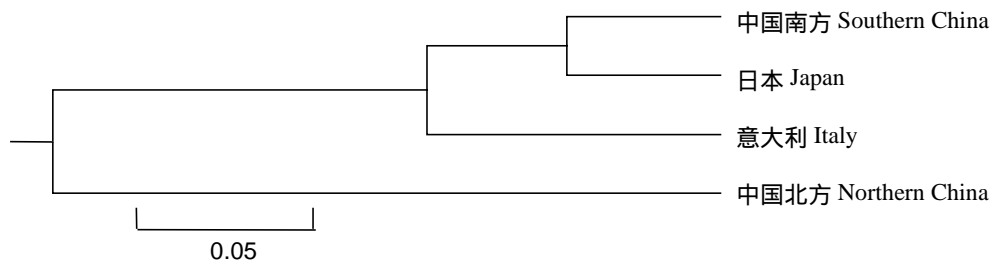


图2 CHV1病毒群体的UPGMA聚类图

Fig. 2 Phenogram of genetic distances among *Cryphonectria hypovirus 1* populations based on a partial nucleotide sequence from ORF A

素粉柱层析提取的dsRNA都只有一条约12.7 kb的电泳带, RT-PCR产物也都只有一条约425 bp的电泳带, 说明供试菌株中都有且只有CHV1病毒。但获得不同病毒株的cDNA所要求的PCR条件略有不同, 有的菌株的RT-PCR产物甚至没有可见的电泳条带, 表明引物对不同病毒的结合能力有所差异, 即不同菌株所含的CHV1病毒至少在与引物结合部位的碱基序列上存在一定的多态性。

本研究表明, 中国的CHV1病毒在核苷酸水平上表现出明显的多态性, 且中国CHV1病毒群体的多样性比日本和意大利都丰富。测定的30个病毒株在核苷酸水平上差异显著, 其序列共可分为29个单元型。Chung等(1994)在对CHV2病毒的研究后也曾得出相似的结论。他们测定了新泽西一个小群体中几个CHV2的ORF B中400 bp的序列, 没有发现完全相同的病毒株出现。各病毒测序区域的碱基数有很大的差异, 不同病毒株之间的碱基差异数目在0-142之间, 变异率为0-33.57%。亚型和亚型之间的变异率最高, 为26.53%-33.57%, 而亚型和亚型之间的变异率范围是27.96%-30.81%, 亚型和亚型之间的变异率范围是5.45%-12.53%, 均比亚型和亚型之间的变异率低。其中亚型和亚型都有中国病毒株, 亚型都是日本病毒株(图1), 表明中国CHV1病毒的多态性比日本的丰富。意大利的低毒性病毒主要为亚型(仅IT192属于亚型), Gobbin等(2003)测定了来自欧洲的47个病毒株长度为298 bp的片段的序列, 结果可分为26个单元型, 表明欧洲的CHV1病毒群体多样性不是很丰富, 存在多个病毒株同属于一个单元型的情

况, 同时也说明中国CHV1病毒的多样性比欧洲的丰富。

对来源于不同地区的CHV1病毒群体的分析表明, 中国北方群体与日本群体间的遗传距离最大, 达0.398; 而中国南方群体与日本群体间的遗传距离最小, 只有0.087; 中国南方群体与中国北方群体间的遗传距离是0.384, 仅次于北方群体与日本群体间的遗传距离; 意大利群体与中国南方群体、日本群体、中国北方群体间的遗传距离分别为0.165、0.167、0.352(表3、图2)。说明意大利CHV1病毒可能起源于中国南方, 也可能起源于日本, 因为意大利CHV1病毒群体与这两者的遗传距离相差不大。要确切地说明欧洲CHV1病毒的起源还有待进一步的研究, 但研究结果至少可以说明意大利CHV1病毒不会起源于中国北方。

根据30个序列的位于ORF A部分推导出来的氨基酸序列进行分析, 得到的系统树(数据未列出)与图1是一致的, 只有Ja28与同亚型的其他病毒株相距太远, 因为其核苷酸在测序段第304位的G发生了缺失, 导致下游的密码子被打乱。

本实验结果表明中国的CVH1病毒的进化历史比欧洲长得多, 这正印证了欧洲CVH1病毒起源于亚洲的假设。Gobbin等(2003)根据他们的实验结果分析了欧洲CHV1病毒的进化时间和来源, 表明欧洲的CHV1病毒至少有几百年的历史, 同时得出了一个与Allemann等(1999)相同的结论, 即欧洲的CHV1病毒有多种来源。本研究使用的材料和结果难以用来进行进化时间的分析, 另外不同的地理环境以及不同的栗疫病菌群体都会给CHV1病毒带来不同的进化压力(Milgroom,

1995), 因而具体地确定中国的CHV1病毒的进化历史, 有待进一步的研究。

中国CVH1病毒两个亚型的地理分布都很广泛, 但也有各自的特点。亚型 主要分布在长江以北, 其中只有09344病毒株是个例外; 而亚型 主要分布在长江以南, 其中也有例外, 这不同于欧洲主要以CHV1病毒 型为主的情况。

致谢 中国科学院武汉植物研究所王宏文研究员为本实验提供了部分菌株; 意大利、日本菌株由康奈尔大学植病系M. G. Milgroom博士实验室提供; 中国水产科学研究院黄海水产研究所的刘云国博士为本实验的数据分析提供了大量帮助; 美国马里兰大学生物技术研究院的Donald L. Nuss博士提供了部分参考文献。

### 参考文献

- Allemann C, Hoegger P, Heiniger U, Rigling D (1999) Genetic variation of *Cryphonectria hypoviruses* (CHV1) in Europe assessed using RFLP markers. *Molecular Ecology*, **8**, 843–854.
- Chen B, Nuss DL (1999) Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1-Euro7: a comparative virology approach to investigate fungus-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology*, **73**, 985–992.
- Chung PH, Bedker PJ, Hillman BI (1994) Diversity of *Cryphonectria parasitica* hypovirulence-associated double-stranded RNAs within a chestnut population in New Jersey. *Phytopathology*, **84**, 984–990.
- Dodds JA (1980) Revised estimates of the molecular weights of dsRNA segments in hypovirulent strains of *Endothia parasitica*. *Phytopathology*, **70**, 1217–1220.
- Gobbin D, Hoegger PJ, Heiniger U, Rigling D (2003) Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1) in Europe. *Virus Research*, **97**, 39–46.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Research Symposium Series*, **41**, 95–98.
- Hillman BI, Fulbright DW, Nuss DL, van Alfen NK (1995) Hypoviridae. In: *Sixth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses* (eds Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD), pp. 261–264. Springer-Verlag, New York.
- Hillman BI, Halpern BT, Brown MP (1994) A viral dsRNA element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. *Virology*, **201**, 241–250.
- Hillman BI, Tian Y, Bedker PJ, Brown MP (1992) A North American hypovirulent isolate of the chestnut blight fungus with European isolate-related dsRNA. *Journal of General Virology*, **73**, 681–686.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, **17**, 1244–1245.
- Liang P, Chen K, Chou S, Quan Y (1994) Isolation and transmission of dsRNA from Chinese *Endothia parasitica* and homology of dsRNA from Chinese, European and US strains. In: *Proceedings of International Chestnut Conference* (eds Double ML, MacDonald WL), pp. 19. West Virginia University Press, Morgantown.
- Milgroom MG (1995) Population biology of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Canadian Journal of Botany*, **3** (Suppl. 1), 311–319.
- Peever TL, Liu YC, Milgroom MG (1997) Diversity of hypoviruses and other double-stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in North America. *Phytopathology*, **87**, 1026–1033.
- Peever TL, Liu YC, Wang K, Hillman BI, Foglia R, Milgroom MG (1998) Incidence and diversity of double-stranded RNAs occurring in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica* in China and Japan. *Phytopathology*, **88**, 811–817.
- Quan Y(全勇), Liang PY(梁平彦), Chen KY(陈开英), Zhou SM(周淑敏) (1994) Sequence homology of dsRNA among Chinese, European and American strains of *Cryphonectria parasitica*. *Acta Microbiologica Sinica*(微生物学报), **34**, 1–5. (in Chinese with English abstract)
- Rigling D, Hillman BI (2000) Genus *Hypovirus* (Hypoviridae). In: *The Springer Index of Viruses* (eds Tidona CA, Darai G), pp. 456–460. Springer, Berlin, New York.
- Shapira R, Choi GH, Nuss DL (1991) Virus-like genetic organization, expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. *The European Molecular Biology Organization Journal*, **10**, 731–739.
- Xu CX(徐陈贤), Liu FX(刘福秀), Zhou XY(周晓云), Wang KR(王克荣) (2004) Diversity of dsRNA population of *Cryphonectria parasitica* in Eastern China. *Biodiversity Science*(生物多样性), **12**, 370–376. (in Chinese with English abstract)

(责任编辑: 邱并生 责任编辑: 时意专)