

辣椒疫霉可溶性蛋白和酯酶同工酶电泳分析

李萍^{1,2}, 叶涛¹, 郑婷¹, 高智谋^{1*}

(1. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036; 2. 安庆职业技术学院园林园艺系, 安庆 246003)

摘要: 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 (SDS-PAGE) 和 PAGE 电泳技术分别对安徽不同地区的 46 个辣椒疫霉进行可溶性蛋白和酯酶同工酶分析, 从蛋白质和酶学水平上分析辣椒疫霉的生理生化特征。可溶性蛋白电泳表明, 每个辣椒疫霉分离出了 25~37 条谱带, 平均 31.5 条。其中具有多态性的条带共有 24 条, 多态性比率达 64.9%, 可溶性蛋白图谱与地理来源相关, 但与致病力不相关。酯酶同工酶 PAGE 电泳显示辣椒疫霉菌株各有 1~8 条条带, R_f 值为 0.05~1.00, 不同辣椒疫霉菌株间某些同工酶谱带数和同一迁移率谱带的颜色和宽度差异显著, 其中弱致病力菌株的条带数为 1~3 条, 说明菌株的致病力差异可在酯酶同工酶水平上得到反映。

关键词: 辣椒疫霉; 可溶性蛋白; 酯酶同工酶; 电泳图谱

中图分类号: S436.418.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)06-0915-06

Analysis of the soluble protein and esterase isozyme of *Phytophthora capsici* Leonian

LI Ping^{1,2}, YE Tao¹, ZHENG Ting¹, GAO Zhimou¹

(1. School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Department of Horticulture and Landscape, Anqing Vocational and Technical College, Anqing 246003)

Abstract: In order to analyse the physiological and biochemical differentiation among isolates of *Phytophthora capsici* at protein or esterase isozyme level, 46 isolates of the pathogenic oomycete collected from different localities of Anhui province were clustered based on their soluble protein and esterase isozyme profiles obtained through sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), respectively. The soluble protein analysis showed 25 to 37 main bands were obtained with each isolate, with average value of 31.5. Twenty-four of those 37 bands were polymorphic (64.9%), revealing high polymorphism among the isolates. The soluble protein group had a certain correlation with the localities of isolates, but no relation with the pathogenicity. The esterase isozyme analysis showed each isolate had 1 to 8 main bands and the R_f -value ranged from 0.05 to 1.00. The obvious difference in the numbers of bands and activities of bands with the same R_f value was also detected. The bands of weakly pathogenic isolates were 1 to 3, which supported that esterase isozyme patterns could be indicators to reveal the difference of pathogen pathogenicity.

Key words: *Phytophthora capsici*; soluble protein; esterase isozyme; electrophoresis pattern

辣椒疫霉 *Phytophthora capsici* Leonian 是具有重大危害性的有害生物, 由辣椒疫霉引起的辣椒疫病是一种毁灭性病害, 在世界各地的辣椒种植区普遍发生^[1], 目前已成为限制我国辣椒生产的主要病害之一^[2]。该病害的发生规律、防治方法等研究已有较为系统的报道, 但对辣椒疫霉致病性分化的生化机制则报道较少。众所周知, 辣椒疫病采用以选育抗病品种为中心的综合治理措施, 而品种的抗病

性是针对病原菌的致病性而言的, 抗病品种的选育选用必须以目标病原菌的致病性研究为基础。因此, 研究辣椒疫霉的致病性 (力) 分化生理生化机制对于辣椒抗病品种的选育和合理使用以及辣椒疫病的综合治理均具有十分重要的理论和应用意义。

微生物体内的蛋白质和同工酶都是基因表达的产物, 其结构的多样性能直接反映 DNA 组成上的差异和生物体的遗传多样性, 蛋白质和同工酶被广

收稿日期: 2015-04-29

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (070411028) 和农业部公益性行业科研专项 (201303018) 共同资助。

作者简介: 李萍, 博士, 讲师。E-mail: liping2012@aqvtc.cn

* 通信作者: 高智谋, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: gzm@ahau.edu.cn

泛应用于生物的遗传标记、遗传变异以及遗传结构研究中。蛋白质与酯酶同工酶电泳图谱具有相对稳定性,能够真实地反映物种间的亲缘关系。蛋白质与酯酶同工酶电泳技术作为化学分类方法之一,自1959年由 Markert 等^[3]提出以来,近年来被广泛应用于动物、植物的遗传分析、生理生化研究^[4-5]。前人研究表明,辣椒疫霉的致病力存在分化,而许多学者认为,病菌不同的致病类型与酯酶同工酶有较密切的关系^[6-7]。所以,对同工酶的研究也就显得尤为重要,分析同工酶的酶谱是同工酶研究的重要方法。本试验对不同来源的辣椒疫霉菌体进行可溶性蛋白和酯酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳,对它们在蛋白质和酶学水平上的遗传差异进行研究,并构建树状聚类图,探讨不同菌株电泳图谱差异与菌株的

地理来源和致病性的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 从安徽不同地理来源的发病辣椒上采集辣椒疫病病株,采用组织分离法使用选择性培养基对病原菌进行分离,获得的46个分离物经形态学鉴定为辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)后,单孢分离并保存备用。标准交配型菌株 P991(A₁交配型)由南京农业大学真菌研究室王源超教授惠赠。采用活体针刺接种法测定辣椒疫霉对艳阳植株苗的致病力,菌株编号、采集地及辣椒疫霉对辣椒所致病斑长度如表1所示。

表1 供试辣椒疫霉菌株来源及致病力测定结果

Table 1 Pathogenicity of different isolates of *Phytophthora capsici* from Anhui to pepper seedlings

菌株编号 Isolate No.	采集地 Source location	所致病斑长度/mm Average length of stem lesions	菌株编号 Isolate No.	采集地 Source location	所致病斑长度/mm Average length of stem lesions
HN1	淮南 Huainan	15.7	HX4	和县 Heixan	53.7
HN2	淮南 Huainan	21.8	ST1	石台 Shitai	60.2
HN3	淮南 Huainan	5.7	ST2	石台 Shitai	58.2
HN4	淮南 Huainan	23.7	TL3	铜陵 Tongling	54.2
HN5	淮南 Huainan	23.0	TL5	铜陵 Tongling	32.8
HN6	淮南 Huainan	50.0	TL7	铜陵 Tongling	31.2
HN7	淮南 Huainan	32.3	TL9	铜陵 Tongling	53.2
HN8	淮南 Huainan	36.0	TL10	铜陵 Tongling	57.6
HF1	合肥 Hefei	52.3	TL11	铜陵 Tongling	25.0
HF2	合肥 Hefei	41.7	YS1	阜阳 Fuyang	59.4
HF3	合肥 Hefei	35.3	YS2	阜阳 Fuyang	53.0
HF4	合肥 Hefei	63.7	FY1	阜阳 Fuyang	37.2
HF5	合肥 Hefei	36.7	FY2	阜阳 Fuyang	54.2
HF6	合肥 Hefei	45.9	LXH	亳州 Bozhou	54.6
HF7	合肥 Hefei	37.7	BZ1	亳州 Bozhou	53.8
QS1	潜山 Qianshan	45.0	BZ2	亳州 Bozhou	53.4
QS2	潜山 Qianshan	41.7	BZ5	亳州 Bozhou	53.8
QS3	潜山 Qianshan	55.0	BZ6	亳州 Bozhou	61.8
YX1	岳西 Yuexi	22.7	BZ7	亳州 Bozhou	51.6
YX2	岳西 Yuexi	32.0	BZ8	亳州 Bozhou	51.0
HX1	和县 Heixan	29.0	BZ9	亳州 Bozhou	58.0
HX2	和县 Heixan	8.3	BZ10	亳州 Bozhou	53.4
HX3	和县 Heixan	6.0	BZ11	亳州 Bozhou	53.2

1.1.2 供试培养基 胡萝卜培养基培养基(CA):将200g新鲜胡萝卜切成小片,加去离子水500mL,煮沸后计时30min,用双层纱布过滤去渣,补水至1000mL,加入琼脂20g,121°C高压蒸汽灭菌20

min。

Plich's液体培养基:KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.25g, 天冬酰胺 1g, 硫胺素 1mg, 酵母浸膏 0.5g, glucose 25g, 去离子水定容至1000mL, 121°C

灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 样品的制备 将供试菌株在 CA 平板上 25 °C、黑暗中生长 3 d 后, 用打孔器沿菌落边缘打直径为 7 mm 的菌碟, 接入盛有 100 mL Plich's 液体培养基的组织培养瓶中, 每瓶接菌碟 3 块, 25 °C、黑暗振荡 (100 r·min⁻¹) 培养。6 d 后用纱布过滤, 将菌丝丛中的培养基小块去掉, 菌丝体用 25% 乙醇冲洗, 再用去离子水反复冲洗 3~4 次, 在双层纱布中挤出多余的水分。收集冲洗后的菌丝并称湿重, 按 1:1 (W/V) 加入 pH 6 的磷酸缓冲液 (0.2 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 123 mL 与 0.2 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 877 mL 混合配制), 冰冻过夜。将冰冻后的菌丝体置于研钵中, 加入少量石英砂, 在冰浴下充分研磨成糊状。研磨后的菌丝液在 12000 r·min⁻¹、4 °C 下离心 20 min, 然后再重复离心 2~3 次, 得上清液即为菌丝可溶性蛋白质电泳样品, 放在 -20 °C 冰箱中保存备用。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (1) SDS-PAGE 可溶性蛋白电泳。实验采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 在 DYY26 型稳压稳流电泳仪上进行电泳 (北京六一仪器厂生产), 电泳时使用 8% 分离胶 (pH 8.8) 和 4% 浓缩胶 (pH 6.8), 电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲系统。蛋白质样品在上样电泳前需变性, 将样品蛋白质溶液与等体积的上样缓冲液混合后置于 eppendorf 管中, 将混合物置于 100 °C 煮 5 min (在 eppendorf 管盖上用注射器的针头打 2~3 孔), 立即置于冰上冷却 3 min 后加样, 每孔上样量 100 μg, 在电泳槽中加入电极缓冲液并滴加 2 滴 1% 溴酚蓝指示前沿线, 电泳。在稳流工作状态下, 控制电压强度为浓缩胶每孔 60 V, 分离胶中每孔 80 V, 在 4 °C 条件下电泳 2 h 左右。电泳结束后, 将凝胶置于 R-250 的考马斯亮蓝染液中, 将其放在摇床上震荡大约 30 min, 去除染色液, 加入 7% 乙酸的脱色液继续振荡, 为了完全脱色, 在脱色过程中视情况多次更换脱色液直至背景色脱干净为止, 固定后拍照。

(2) 菌体酯酶 PAGE 电泳。实验采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 7.5% 分离胶 (pH 8.9), 3% 浓缩胶 (pH 6.7)。电泳上样量与电压强度同可溶性蛋白电泳。电泳结束后用固兰 RR 盐染色液 37 °C 染色 30 min, 染色后用 7% 的乙酸脱色固定, 固定后的凝胶即可用于观察、分析和拍片。

1.2.3 电泳图谱的聚类分析 将电泳后的凝胶图谱放到扫描仪上进行扫描, 测量各谱带的泳动距离, 计算每条谱带的 R_f 值。将电泳获得的每一条条带的有无作为统计参数, 有带赋值为“1”, 无带赋值为“0”, 从而得到 46 个菌株蛋白和酯酶电泳的“0、1”矩阵。根据 Nei 等的公式: $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$, 获得各样品间的遗传相似度, 其中 N_{xy} 为个体 X、Y 经电泳后的共有条带数, N_x 、 N_y 分别代表个体 X、Y 经电泳后的条带总数, 遗传相似度越大, 说明酶谱差异越小, 菌株间亲缘关系密切, 反之则说明差异越大, 菌株间亲缘关系越远。用 NTSYSpc version 2.1 软件进行数据分析, 采用 UPGMA 法 (Unweighted Pair-group Method Arithmetic Averages 算术平均数不加权对组法) 生成辣椒疫霉的蛋白和酯酶电泳聚类分析树状图。

2 结果与分析

2.1 辣椒疫霉的可溶性蛋白质电泳图谱分析

可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱 (图 1) 显示, 辣椒疫霉可溶性蛋白电泳产生大量的条带, 不同地理来源的 46 个菌株分别分离出了 25~37 条谱带, 平均 31.5 条。经过计算分析, 辣椒疫霉的 R_f 值为 0.10~0.98, 特征性条带的 R_f 值为 0.36、0.45、0.47、0.50、0.53、0.59、0.60、0.71、0.76、0.86、0.91、0.95 和 0.98, 共 13 条。多态性的条带共有 24 条, 多态性比率达 64.9%。从电泳图谱可以看出 (图 1), 不同辣椒疫霉菌株的可溶性蛋白谱带不仅数量上有差异, 同时不同菌株间相同谱带的颜色和宽度也有差异, 表明不同菌株酶的活性不同。

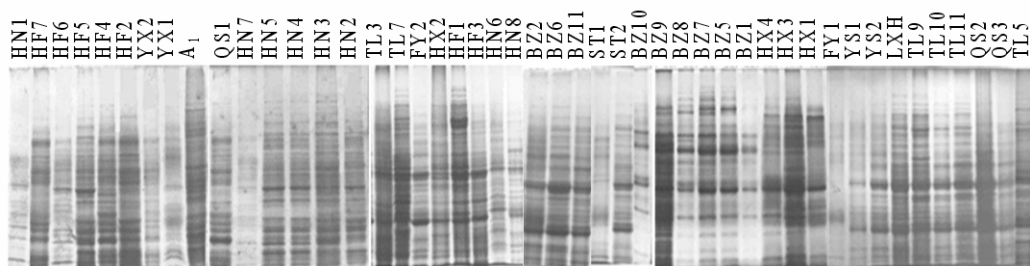


图 1 可溶性蛋白电泳谱带照片

Figure 1 Soluble proteins electrophoretic gel of *Phytophthora capsici* from different locations

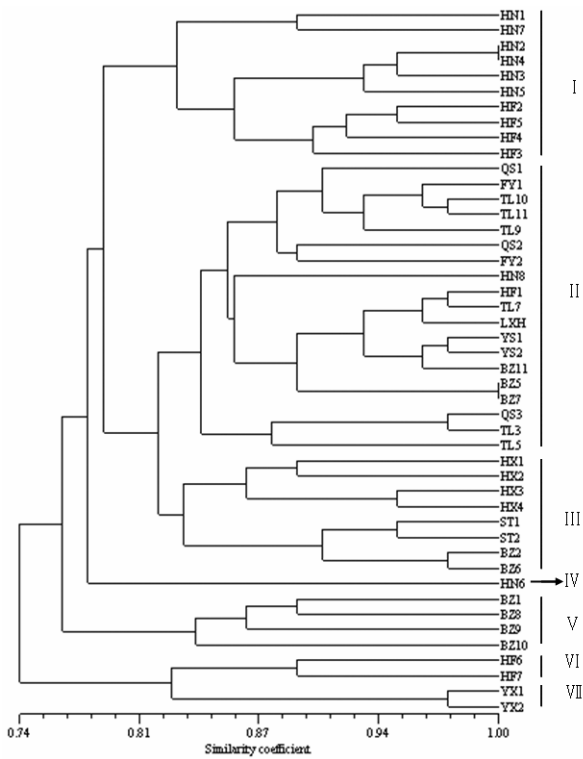


图 2 辣椒疫霉可溶性蛋白电泳谱带聚类树状图

Figure 2 The dendrogram based on similarity coefficient from soluble proteins study of *Phytophthora capsici* from different locations

由相对迁移率可以看出菌株之间的相似性，为更直观，因此，利用遗传相似系数反应各供试菌株的亲缘关系。从供试菌株菌体可溶性蛋白电泳的系统树状聚类图（图 2）可以看出，辣椒疫霉不同菌株间的相似系数在 74%~100%。以相似系数 82%为

阈值，将供试菌株分为 7 大组，第 I 组为淮南与合肥菌株，分为 3 个亚组，菌株 HN1 与 HN7 为一亚组，菌株 HN2、HN3、HN4 和 HN5 为一亚组，菌株 HF2、HF3、HF4 和 HF5 为一亚组；第 II 组最大，有 19 个菌株，来源较广，有淮南、合肥、亳州、铜陵、阜阳、和县和潜山的菌株；第 III 组为和县、石台和亳州菌株，分为 3 个亚组，菌株 HX1、HX2、HX3、HX4 为一亚组，菌株 ST1 和 ST2 为一亚组，菌株 BZ2 和 BZ6 为一亚组；第 IV 组仅有菌株 HN6；第 V 组含有菌株 BZ1、BZ8、BZ9 和 BZ10；第 VI 组含有菌株 HF6 和 HF7；第 VII 组含有菌株 YX1 和 YX2。从上可以看出，除第 II 组外，所有其他组每个亚组都是按照地理来源聚类的；第 II 组为一大组，地理来源广泛，表明这些菌株间可能存在基因交流，使得相互间遗传一致度增高，亲缘关系近。从聚类图还可以看出，菌株 HN6 与其他菌株的遗传距离最大。该聚类图与以往致病力的研究结果比较，发现可溶性蛋白与致病力不相关，与地理来源相关。

2.2 辣椒疫霉酯酶同工酶电泳

酯酶同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱（图 3）显示，46 个辣椒疫霉菌株各具有 1~8 条清晰并且颜色深的条带，平均为 2.8 条， R_f 值为 0.05~1.00。辣椒疫霉酯酶同工酶的特征性条带为 0.42。其中，菌株 HF3 和 FY2 的条带颜色较深，谱带较宽；菌株 HN6 的酶带数最多为 8 条。不同菌株间酯酶同工酶的谱带在数量、颜色、宽度上存在差异，具有丰富的谱带和丰富的等位酶基因，说明了辣椒疫霉在同工酶水平上具有丰富的多态性。

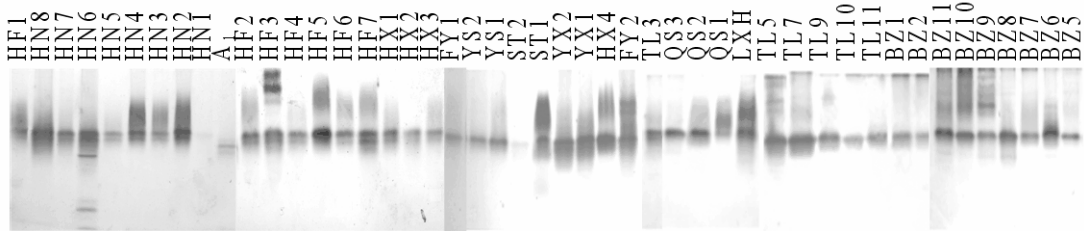


图 3 酯酶同工酶电泳谱带照片

Figure 3 Esterase isozyme electrophoretic gel of *Phytophthora capsici* from different locations

用遗传相似度来评价菌株间的亲缘关系，分析表明这些酶谱标记在菌株间的相似度为 22%~100%，辣椒疫霉菌株之间表现出高度的遗传多样性。经聚类分析图（图 4）显示，各菌株大约在相似性系数 0.53 水平上聚合在一起，以相似性系数 0.83 为阈值，供试的 46 个辣椒疫霉分为 6 组，a 组包括 HN1、HN2、HN3、HN4、HN5、HN7、HN8、HF1、HF2、HF4、HF5、HF6、HF7、QS1、QS2、

QS3、YS1、YS2、LXH、HX1、HX2、HX3、HX4、ST1、ST2、YX1、YX2、TL3、TL7、TL9、TL10、TL11、BZ1、BZ2 和 BZ5 等 35 个菌株；b 组包括 HF3 和 FY2 等 2 个菌株；c 组包括 TL5 和 BZ6 等 2 个菌株；d 组包括 FY1、BZ7 和 BZ8 等 3 个菌株；e 组包括 BZ9、BZ10 和 BZ11 等 3 个菌株；f 组只包括一个菌株 HN6。在划分的 6 个组别中，a 组 35 个菌株的遗传相似度为 50%~100%，酶带为 1~3 条，

与以往致病力结果比较发现, 致病力弱的菌株全部集中在 a 组, 有些强致病力菌株也划为 a 组, 但其共同谱带颜色和宽度明显不同 (如菌株 LXH); b 组 2 个菌株的遗传相似度 80%, 酶带 4~6 条, 酶带颜色深, 为中-强致病力菌株; c 组 2 个菌株的遗传相似度为 83%, 酶带各为 6 条; d 组 3 个菌株的遗传相似度为 25%~100%, 酶带各为 4 条; e 组 3 个菌株的遗传相似度为 86%~93%, 酶带为 6~8 条; 菌株 HN6 与其他菌株的相似度都很低, 遗传距离较远, 是相对独特的菌株。综合考虑酶带颜色深浅和宽度差异, 弱致病力菌株的酯酶同工酶谱带数为 1~3 条, 颜色较浅。菌株的酯酶同工酶谱相似性与地理来源未表现出相关性, 与致病力强弱相关。

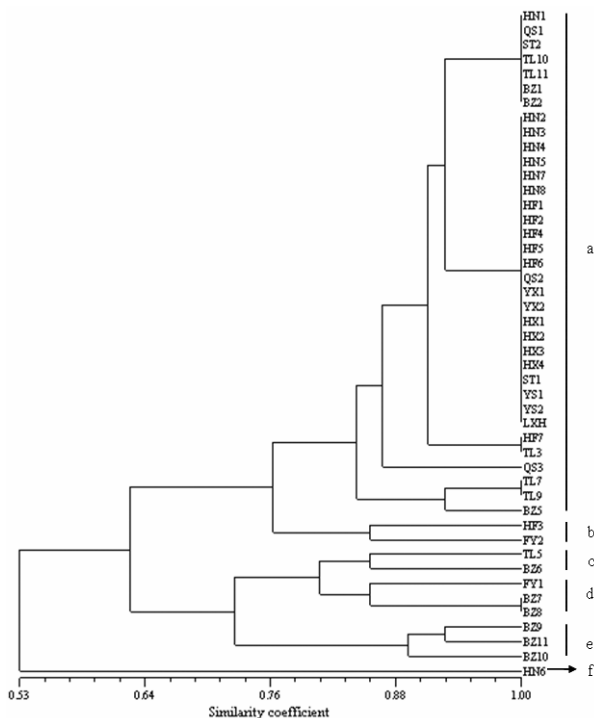


图 4 辣椒疫霉酯酶同工酶电泳谱带聚类树状图

Figure 4 The dendrogram based on similarity coefficient from esterase isozyme study of *Phytophthora capsici* from different locations

3 讨论

蛋白质是基因的表达产物, 因此, 蛋白质电泳图谱的差异在一定程度上反映了物种间遗传上的异质性, 即由生化表现型反映基因型, 这是应用电泳分析进行分类的理论基础。近年来, 蛋白质电泳技术为真菌鉴定和遗传比较等方面奠定了较坚实的基础, 真菌蛋白质图谱在一定程度上也可以作为其分类的特征^[8], 采用菌体可溶性蛋白质的电泳分析作为分类的辅助手段得到了应用和发展^[9-10], 徐大雅

等曾用菌体蛋白质的电泳分析了马铃薯晚疫病菌的小种^[11]。本试验研究了辣椒疫霉可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳, 结果表明, 供试菌株产生了大量的条带, 表现出丰富的蛋白质多样性, 电泳谱带相似系数为 74% 以上, 说明可溶性蛋白图谱具有种的特征性, 与许多报道相似^[12-13]。同时发现可溶性蛋白与致病力不相关, 与地理来源相关, 除了其中一组外, 其他 6 大组的每个亚组均按照地理来源划分的。因此, 能否用可溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳的指标进行辣椒疫霉菌的致病性和生理小种鉴定与划分, 尚难定论, 还需要进一步深入研究。因为病原物的致病性虽然是由基因调控, 可通过生化性状表达出来, 但这种表达不一定反应在这种指标上, 而且致病性只是病原物众多生物学性状之一, 其他生物学性状上的差异也会影响电泳条带的差异。第 II 组的菌株来源比较广泛, 表明这些菌株间的基因交流可能比较活跃, 使得相互间遗传一致度增高, 亲缘关系近。

近年来, 酯酶同工酶技术应用于农作物的起源问题已相对广泛^[14], 酯酶同工酶图谱在一定程度上可以作为其分类的特征^[15]。作者对安徽省不同地理来源的辣椒疫霉菌株进行了 PAGE 电泳, 发现供试菌株都有 1~8 条清晰并且颜色深的条带, 所有致病力弱的菌株都聚在 a 组, 条带数为 1~3 条, 条带数少, 表明弱致病力菌株的酯酶同工酶条带数可能少或者条带颜色较浅, 但条带少的菌株致病力不一定弱, 主要表现在条带的宽度和颜色上, 可能还与其他生理生化机制相关。

同时, 辣椒疫霉不同地理来源的菌株可溶性蛋白和酯酶同工酶电泳图谱都有特征性酶带的存在, 说明试验研究的 46 个菌株具有共同的遗传基础; 而在谱带有无上的差异说明各菌株在不同的生长环境中发生了遗传变异。辣椒疫霉在地理来源的同源性在可溶性蛋白电泳的聚类结果中体现得较为明显, 这种地理分布上的同源性在酯酶同工酶电泳的聚类结果中并没有得到较好的体现。在这 2 种电泳中, 菌株 HN1、HN2、HN3、HN4、HN5、HN7、HF2、HF4 和 HF5; 菌株 QS1、TL10 和 TL11; 菌株 YS1 和 YS2; 菌株 HX1、HX2、HX3 和 HX4; 菌株 ST1 和 ST2; 菌株 BZ9 和 BZ10, 菌株 YX1 和 YX2 都表现出了较近的亲缘关系。因此, 在用生化方法分析病原菌间亲缘关系时, 宜将不同内容的电泳结果综合考虑。

此外, 无论是在可溶性蛋白还是酯酶同工酶树状聚类图中, 菌株 HN6 与其他菌株的遗传距离最远, HN6 的酯酶条带与其他菌株存在明显的差异。

作者利用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 对菌株 HN6 进行了 PCR 扩增和 rDNA-ITS 区的序列分析, 结果发现菌株 HN6 的 ITS 区与 GenBank 中的辣椒疫霉同源性达 99~100%, 进一步证明菌株 HN6 为辣椒疫霉。因此 HN6 的酯酶条带与其他菌株存在的明显差异是辣椒疫霉种内菌株类群的差异。有关这种差异与何种性状相关尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Hausbeck M K, Lamour K H. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges [J]. Plant Disease, 2004, 88: 1292-1303.
- [2] Li P, Cao S, Dai Y L, et al. Genetic diversity among isolates of *Phytophthora capsici* in Anhui based on ISSR-PCR markers [J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11: 4285-4296
- [3] Markert C L. Multiples forms of enzymes: tissue, ontogenetic and specific patterns [J]. Proc Nat Acad Soc USA, 1959, 45: 753-763.
- [4] 朱坚, 黄聿善, 姜平. 香菇菌株酯酶同工酶谱及其模糊聚类分析[J]. 福建农业学报, 2000, 15(3): 46-50.
- [5] 刘庆, 徐兴华. 电泳法分析食用菌酯酶同工酶方法的优化[J]. 生命科学仪器, 2008, 6: 42-44.
- [6] 吕金殿. 我国棉花枯萎病菌酯酶同工酶测定初报[J]. 植物病理学报, 1982, 12(2): 41-45.
- [7] 李清铤. 江苏麦类镰刀菌酯酶同工酶测定[J]. 植物病理学报, 1985, 15: 217-223.
- [8] 徐敬友, 陆家云, 方中达. 六种疫霉菌体可溶性蛋白质和酯酶的聚丙烯酰胺凝胶平板电泳研究[J]. 真菌学报, 1993, 12(1): 54-61.
- [9] 叶华智. 麦类赤霉病穗腐镰刀菌酯酶同工酶谱的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析[J]. 植物病理学报, 1985, 15: 87-94.
- [10] Bielenin A. Separation by protein electrophoresis of six species of *Phytophthora* associated with deciduous fruit crops [J]. Phytophthology, 1988, 78: 1402-1408.
- [11] 徐大雅. 马铃薯晚疫菌生理小种的蛋白质电泳分析[J]. 真菌学报, 1982(1): 40-47.
- [12] Stasz T E, Weeden N F, Harman G E. Method of isozyme electrophoresis for *Trichoderma* and *Gliocladium* species [J]. Mycologia, 1988, 80: 870-874.
- [13] Stasz T E, Nixon K, Harman G E. Evaluation of phenetic species and phylogenetic relationships in the genus *Trichoderma* by cladistic analysis of isozyme polymorphism [J]. Mycologia, 1989, 81: 391-403.
- [14] 方德秋. 应用同工酶进行柑橘分类及进化研究[J]. 植物分类学报, 1993, 31: 329-352.
- [15] 黄大斌, 杨菁, 林杰. 寿宁花菇菌株的酯酶同工酶研究[J]. 中国食用菌, 1999, 19: 33-34.