

大豆疫霉菌检测鉴定方法

刘春来¹, 李新民¹, 杨明秀²

(¹黑龙江省农科院植物保护研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; ²东北农业大学农学院植保系, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:大豆疫霉菌是一种较难分离和培养的病原菌, 在国内, 也是一种重要的植物检疫对象。因此, 对大豆疫霉菌分离、鉴定方法的研究显得尤为重要。其传统的分离检测鉴定方法主要有病组织分离法、土壤诱集检测法等, 近年来, 随着生物技术的发展, 血清学技术、同工酶技术及核酸技术等已应用到大豆疫霉菌的检测鉴定中。现综述这些方法在大豆疫霉菌检测鉴定中的应用现状, 并对这些方法的应用进行评价。

关键词:大豆疫霉菌; 病原菌; 检测

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2008)03-0527-05

Methods for Detection and Identification of *Phytophthora sojae*

LIU Chun-lai¹, LI Xin-min¹, YANG Ming-xiu²

(¹Institute of Plant Protection, Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin 150086, Heilongjiang; ²Department of Plant Protection, Agriculture College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: *Phytophthora sojae*, as an important plant quarantine pathogen in China, is difficult to isolate and culture. It is important to studying on the methods of isolating and identifying *Phytophthora sojae*. The traditional isolation and detection methods include pathogen isolated from the infected tissue and soil baiting. With the development of biology technology, serology, isoenzymes and nucleic acid technology have been applied for detection of *Phytophthora sojae* in recent years. The applied condition of these methods in detection and identification of *Phytophthora sojae* were reviewed and evaluated.

Key words: *Phytophthora sojae*; Pathogen; Detection

大豆疫霉根腐病 (*Phytophthora root rot*, 简称 PRR) 是由大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann) 侵染引起的、危害极其严重的、最具毁灭性的大豆病害之一, 在环境条件有利于病害发生的情况下可导致大豆绝产。1948 年在美国东北部的印第安那州首次发现该病, 之后相继在加拿大、葡萄牙、意大利、日本、前苏联、澳大利亚、阿根廷和新西兰等国发生。自从 Suchovecky 1955 年首次报道该病后, 目前该病已传播到世界各大豆产区, 成为严重影响大豆生产的主要病害之一^[1]。鉴于大豆疫霉菌的破坏性和毁灭性, 在 1986 年曾被列为中国进口植物检疫对象; 自 1992 年起大豆疫霉根腐病被中国列为“进境植物危险性病虫害名录”中的第 I 类病害; 之后 1995 年大豆疫霉菌又被列为中国植物检疫对象^[2]。大豆疫霉菌的传统检测鉴定方法主要有病组织分离法、土壤诱集检测法等, 其缺点就是

检测所需时间太长、程序繁琐、灵敏度低。近年来, 随着生物技术的发展, 包括血清学技术、同工酶技术及核酸技术等已应用到大豆疫霉菌的检测鉴定中, 使得大豆疫霉菌的检测鉴定技术取得了长足的进步。

1 传统检测鉴定方法

植物病原真菌的分类与鉴定是植物病理学的基础工作。传统的以形态及发育学特征为依据的病原真菌鉴定方法一直是人们普遍采用的。同其它真菌一样, 大豆疫霉菌的传统鉴定方法是通过对其形态学、生物学、生理学及致病性特征的描述, 对照已有的研究资料确定其分类地位。在大豆疫霉菌的检验鉴定中经常被采用的方法主要是病组织分离法和土壤诱集检测法。

由于大豆疫霉菌侵染所造成的患病部位经常感

收稿日期: 2007-09-18

基金项目: 国家“十五”科技攻关资助项目 (2004BA520A16-0106)。

作者简介: 刘春来 (1975-), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事大豆病虫害生物防治研究。Tel: 0451-86668750; E-mail: liuchunlai@163.com。

通讯作者: 李新民, 研究员。Tel: 0451-86668750; E-mail: xinmin63@yahoo.com.cn。

染其它大豆根腐病菌和腐生菌,因此分离培养和纯化有一定难度。病组织分离法主要通过两步来进行(1)大豆疫霉菌的分离:选取新鲜典型病株,切取一段约 5 cm 以上病健交界处的茎秆,用自来水将茎秆冲洗干净;70% 的酒精对分离部位进行表面消毒 10 s,然后用无菌水充分冲洗,并用无菌吸水纸将水吸干;在病健交界处切取 10 mm² 大小的组织,将分离组织接种到选择性培养基上。室温 22 ~ 25℃ 条件下培养 3 d,在显微镜下进行观察,确定为疫霉菌菌丝后将其转移到胡萝卜(CA)或利马豆(LA)培养基上进行扩繁。常用的选择性培养基有 CA - PARPH^[3]、PVP、PARP 和 PBNIC;尤以 PBNIC 或其改良型更为实用^[4]。选择性培养基一般用稀释 V₈ 汁琼脂、胡萝卜汁琼脂、利马豆琼脂或芸豆琼脂作为基础培养基,再加入真菌和细菌抑制物如匹马霉素(Pimaricin)、五氯硝基苯(PCNB)及恶霉灵(Hymexazol)等。(2)大豆疫霉菌的鉴定:就是对分离菌株的培养性状和病原菌的形态特征进行观察,测量;然后进行各项生理指标和致病性测定;从而确定是否为大豆疫霉菌。

大豆疫霉菌是典型的土传病原菌,在土壤中有大量的越冬卵孢子存在。只要条件适宜,成熟的、度过休眠期的卵孢子随时都可以萌发形成孢子囊和游动孢子,侵染寄主造成发病。因此实现对土壤中大豆疫霉菌的检验也显得尤为重要,土壤诱集检测法的原理是一般采用在病土中种植感病品种或用叶碟法诱捕土壤中的病菌游动孢子,然后用含有多种抗菌素的培养基从新发病的植株或叶碟分离并纯化病原菌^[5-6]。目前使用最广泛和最为经济的方法是 Canaday 和 Schmitthenner^[7] 建立的大豆叶碟诱捕法,但由于分离过程中腐霉等杂菌污染率高而效果不理想,有时在还没有加入大豆叶碟进行游动孢子诱捕前,即浸润土壤促进卵孢子萌发时期,许多土壤样品表层已经长满杂菌,致使分离失败。因此,许多学者对叶碟诱捕法进行了改进。左豫虎等^[8] 就土壤诱集检测法和影响因素进行了系统研究,表明诱集前对土壤进行 36℃,4 h 的预处理可明显提高诱集量;预培养过程中土壤含水处于饱和状态,培养时间为 4 ~ 6 d,降低土壤粘度(加入灭菌砂),诱集过程中水面高度在 1.00 ~ 2.13 cm;40 000 lx(光照度)光照条件下诱集 10 ~ 12 h 即可获得较高的诱捕率;检测到的孢子囊数量较多,适于病原菌的土壤检测。朱振东等^[9] 对叶碟诱捕法进行了改进,用不含抗大豆

疫霉菌根腐病基因的大豆叶碟诱捕大豆疫霉菌的游动孢子,将诱捕叶碟直接接种不含抗大豆疫霉菌基因的大豆植株,再对病株进行选择或非选择性分离获得大豆疫霉菌。该方法能十分有效地排除腐霉菌干扰和细菌的污染,直接获得纯化菌株。采用该方法进行大豆疫霉菌土壤分离时,可获得较常规分离方法高的目标菌,但也无法解决由于杂菌的干扰而造成的分离率低的问题。王子迎等^[10] 应用选择性化学药剂青霉素、利福平、五氯硝基苯和多菌灵配制成含药水溶液和含药培养基,其有效成分浓度分别为 50、20、25 和 25 mg · L⁻¹。将含药水溶液直接加到土壤中抑制杂菌,然后用叶碟诱捕大豆疫霉菌,从而改良了土壤叶碟诱捕方法。应用此方法从不同来源的土壤中都分离到了大豆疫霉菌,最高的分离率达到了 75%,而常规诱捕方法的诱捕率只有 11%,说明该方法与常规的诱捕方法相比具有较高诱捕效率和灵敏度。

大豆疫霉菌除了通过病组织和土壤进行远距离传播外,种子表面粘附的卵孢子、甚至种皮内的卵孢子也可以进行病害传播,因此种子中大豆疫霉菌的检验也是不可缺少的环节。周肇蕙和严进^[3] 对种子中大豆疫霉菌的检验方法进行了详细阐述,证实了大豆疫霉菌以卵孢子和菌丝体存在于种子的种皮、胚和子叶里,且卵孢子只产生于种皮。并对种子检验技术和种子带菌分离方法进行了研究,提出大豆疫霉菌根腐病种子检验只需检查种皮、以种皮里大豆疫霉菌卵孢子存在与否为标准。并指出种子中病原菌的分离不宜用常规的分离技术,应当采用种皮的显微镜技术,方能达到种子检验的目的。

2 生物技术在大豆疫霉菌检测鉴定中的应用

近几十年来,使用最广泛和较为可行的真菌鉴定方法是同工酶、可溶性蛋白电泳技术和血清学技术。进入 80 年代以来随着生物技术的发展,核酸技术为植物病原真菌检测开辟了一条新的有效途径,有时用于真菌种的鉴定,但是更多的是用于亚种、变种、专化型和生理小种水平上的鉴定。

2.1 血清学技术—酶联免疫吸附测定(ELISA)

植物病原真菌的检测鉴定大多采用传统方法,即分离培养、显微镜观察形态及简单的生理性状测定等。近年来随着真菌血清学技术和核酸技术的研究及应用,使真菌检测鉴定方法在快速、灵敏方面有

了更大发展。目前 ELISA 在真菌上主要用来检测和鉴定那些难分离的土壤病原菌以及那些难以通过形态鉴定和经常以菌丝形态存在不产生任何子实体的植物病原真菌。近年来有关利用血清学技术检测疫霉菌(包括大豆疫霉菌)的报道较多。国外关于疫霉菌试剂盒已被商业化生产,并已广泛应用^[11]。Klopmeyer 等^[12]用疫霉菌诊断试剂盒检测大豆病组织和土壤中的大豆疫霉菌;宾坦德等^[13]研究了大豆疫霉菌的血清学,并用间接法(I-ELISA)和夹心法(DAS-ELISA)开展了对纯培养和病组织中的大豆疫霉菌的快速检测技术研究。并指出夹心 ELISA 的特异性较强,能够可靠地检测到大豆病组织内的病原菌。文景芝等^[14]用大豆疫霉菌菌丝可溶性蛋白免疫家兔获得的多克隆抗血清,在检测纯培养真菌时准确率达 94%,检测接种发病植株体内目标病原菌时可达 80% 的检出率。

2.2 同工酶技术

同工酶标记作为生化标记除广泛应用于高等动物、植物群体遗传研究外,在真菌种级水平分类上也有广泛应用,但应用于植物病原真菌,特别是同种真菌不同毒力菌株同工酶差异的研究始于 20 世纪 70 年代。目前,50% 以上的酶分子都已发现了其同工酶的存在,可以进行同工酶分析的酶已有 100 多种,但用于植物病原真菌的主要有酯酶(EST)、过氧化物酶(HRP)、过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)和淀粉酶(DIA)等,其中报道最多的是酯酶。

20 世纪 60 年代以来,许多研究表明,菌体可溶性蛋白凝胶电泳是疫霉菌鉴定和分类的一种重要辅助手段。另外,国外有些学者也在探讨酯酶酶谱在疫霉菌研究中的应用,但结论不一。周肇蕙等^[15]对 1992 年分离到的 11 个大豆疫霉菌株进行可溶性蛋白及酯酶同工酶电泳,并以美国的大豆疫霉菌 5 号生理小种标准菌株为对照,结果表明:供试菌株与美国的 Pmg-R5 菌株的谱带具有极大的相似性,主要谱带有着相同的迁移率。Nygaard 等^[16]用同工酶技术分析疫霉菌属的 300 个菌株,结果表明:大雄疫霉(*P. megasperma*)、恶疫霉(*P. cactorum*)、隐地疫霉(*P. cryptogea*)和寄生疫霉(*P. parasitica*)4 个种的同工酶谱带表现出种间多型性,并且利用同工酶分析可以将大雄疫霉(*P. megasperma*)的菌株分成至少 6 个组,其中 3 个组为种内专化型,分别为大豆专化型(*P. megasperma* f. sp. *glycinea*)、苜蓿专化型(*P. megasperma* f. sp. *medicaginis*)和三叶草专化型(*P. me-*

gasperma f. sp. *trifolii*)。文景芝^[17]对大豆疫霉菌的 15 个菌株及其它 7 种疫霉的 8 个菌株进行了酯酶(EST)、超氧化物歧化酶(SOD)、淀粉酶(DIA)和过氧化氢酶(CAT)4 种同工酶酶谱电泳比较研究。结果表明:大豆疫霉菌种内菌株间 4 种同工酶基本一致;EST 和 SOD 酶谱具有种的特异性,疫霉菌种间存在明显差异。并首次报道了大豆疫霉菌的 SOD、CAT、和 DIA 同工酶带。并指出 EST 和 SOD 同工酶在 *P. sojae* 种的鉴定上具有重要意义,为 *P. sojae* 种的鉴定提供一个辅助性手段。

2.3 核酸技术

近年来,分子生物学理论和技术迅速发展及广泛应用,为植物病理学的研究提供了重要的研究方法和技术手段。在植物病原鉴定和检测中,20 世纪 80 年代末开始的基于核酸的植物病原的分子检测方法在灵敏度、检出率及专一性等方面均有了很大的提高,特别是技术的发展使得病原菌的快速、准确、灵敏检测成为可能,因而也被广泛应用于疫霉菌的检测当中^[18-19]。陈宏宇和文景芝^[20]利用 12 个随机引物对参试的 15 株 *P. sojae* 和其它 7 个疫霉种的 8 个菌株共计 23 个菌株进行 PCR,共获得 152 个 RAPD 标记,其中多态性标记占 84.2%,通过聚类分析结果表明:疫霉菌种间的遗传相似系数的变化幅度为 0.533~0.783,大豆疫霉菌与其它几种疫霉的遗传距离相对较远,可以有效地将 *P. sojae* 与其它疫霉菌种区分开来。陈庆河等^[21]对从福建省龙海大豆根腐病株上分离的 6 个代表性疫霉菌株的核糖体 DNA-ITS 序列分析后,与 GenBank 中大豆疫霉菌 ITS 序列进行比对,结果同源性均为 99.8%,并结合形态特征和致病性测定,将这些病原菌定为 *Phytophthora sojae*。这是首次报道大豆疫霉菌在福建省的存在。王立安等^[22]根据大豆疫霉及其近缘卵菌序列差异设计了一对寡核苷酸引物,用于对大豆疫霉菌的检测。结果表明:在优化的反应体系及扩增条件下,该对引物只在大豆疫霉菌为模板的扩增体系中具有 1 条 330 的扩增产物,表现出强特异性。利用该特异引物可稳定地从含有大豆疫霉菌游动孢子或卵孢子的土壤及其发病组织中检测出病原菌。该检测方法对大豆疫霉菌游动孢子和卵孢子的检测理论精度可达 0.5 个孢子。陈长卿等^[23]利用核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列通用引物 ITS1/ITS4 分别获得了大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)和辣椒疫霉(*P. capsici*)的 ITS 序列,通过

获得序列设计了大豆疫霉的特异性引物 PS1 和 PS2,并建立了分子检测方法。该方法对大豆疫霉 (*P. sojae*) 菌丝体和土壤中卵孢子检测的灵敏度分别为 $10^{-5} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和每克土壤 0.05 个卵孢子。

3 展望

植物病原真菌的检测鉴定大多采用传统方法,即分离培养、显微镜观察形态致病性测定及简单的生理生化性状测定等。随着人们认识的深入,传统方法的弱点逐渐显现出来。从系统学的观点看,以形态结构为基础的鉴定方法在一定程度上易受人为因素和环境条件的干扰,不能充分反应物种的进化关系,且耗时长,不适于快速鉴定。从应用和方法学的角度看,真菌的形态和解剖结构复杂多变,且欲获得其有性或无性器官需较长时间。另外,有些种类真菌不易甚至不能形成有性繁殖结构,这就给分类鉴定带来诸多不便,以至于不能满足生物、医药、工业、植物病理等行业日益增长的更高而精确的需求^[24]。较为可行的真菌可溶性蛋白、同工酶电泳技术在真菌的种级分类水平上的应用价值已得到公认,至于种以下分类单位的蛋白质图谱能否作为相应等级的分类性状,尚存争议。同工酶作为遗传标记亦存在一些缺点,主要是其数量有限。对同一种病菌而言,可以利用的数量更为有限。每种酶的最佳条件也不一致,且在制备过程中酶极易失活。此外还要求在实验操作条件、染色方法及菌体培养时间上必须完全一致,才能保证同工酶谱带的差异能够准确、真实地反应不同材料间的差异^[25]。血清学技术在检测病原真菌时,也有许多不足之处,主要是抗血清效价不高、特异性不强,因而很难达到实际应用水平。

近年来分子生物学技术的发展为从核酸分子水平上研究真菌的遗传本质,为真菌的进化研究、系统分类奠定了基础,也为植物病原真菌检测开辟了一条新的有效途径。随着技术的不断改进和程序的简化,核酸技术在不久的将来作为疫霉菌和其他病原菌的常规检测手段必将成为现实。但由于分子生物学技术本身所存在的一些不足,因此在实际研究中必须结合传统分类学上的技术及观点以确保得到客观准确的分类鉴定结果。随着分子生物学知识的积累以及技术的发展,人们将找到更具代表性的分子标记来对真菌进行区分和鉴定,这将极大的影响真菌的分类、系统进化和发育方面的研究。

参考文献

- [1] Schmittener A F. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean[J]. Plant Disease, 1985, 69: 362-368.
- [2] 陈正华,李红卫,陈月颖,等. 大豆疫病在吉林省发生的风险分析和风险管理[J]. 吉林农业科学, 2005, 30(3): 46-48. (Chen Z H, Li H W, Chen Y Y, et al. Analysis and management of risk of occurrence of *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycine* in Jilin province[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2005, 30(3): 46-48.)
- [3] 周肇蕙,严进. 大豆疫病的检疫研究—种子带菌及检验技术[J]. 植物检疫, 1996, 10(5): 257-261. (Zhou Z H, Yan J. Research on quarantine - testing of seed-borne of *Phytophthora sojae* [J]. Plant Quarantine, 1996, 10(5): 257-261.)
- [4] 王良华,丁国云,王源超,等. 大豆疫霉菌检测技术研究进展[J]. 植物检疫, 2006, 20(6): 366-368. (Wang L H, Ding G Y, Wang Y C, et al. Advances in detection technique of *Phytophthora sojae* [J]. Plant Quarantine, 2006, 20(6): 366-368.)
- [5] Athow K L, Laviolette F A, Mueller E H. A new major gene for resistance to *P. megasperma*, var. *sojae* in soybean[J]. Phytopathology, 1980, 70: 977-980.
- [6] 彭金火. 大豆疫霉的土壤诱集检测[J]. 植物检疫, 1998, (4): 198-203. (Peng J H. Study on detecting *Phytophthora sojae* from soil with a baiting method[J]. Plant Quarantine, 1998, (4): 198-203.)
- [7] Canaday C H, Schmittener A F. Isolating *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* from soil with abaiting method that minimizes *Phythium* contamination[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1982, 14: 67-68.
- [8] 左豫虎,臧忠婧,韩文革,等. 大豆疫霉菌的土壤诱集分离检测技术研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2001, 13(2): 7-13. (Zuo Y H, Zang Z J, Han W G, et al. Study on isolating and detecting *Phytophthora sojae* from soil with a baiting method[J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 2001, 13(2): 7-13.)
- [9] 朱振东,王化波,王晓鸣. 一种土壤中大豆疫霉菌分离新方法[J]. 菌物系统, 2003, 22(1): 142-147. (Zhu Z D, Wang H B, Wang X M. A new method of isolating *Phytophthora sojae* from soil[J]. Mycosystema, 2003, 22(1): 142-147.)
- [10] 王子迎,王源超,张正光,等. 土壤中大豆疫霉菌诱捕方法的改进[J]. 植物病理学报, 2005, 35(6): 557-559. (Wang Z Y, Wang Y C, Zhang Z G, et al. An improved method of baiting *Phytophthora sojae* from soil[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(6): 557-559.)
- [11] Ali-Shtayeh M S, Macdonald J D, Kabashima J. A method for using commercial ELISA tests to detect zoospores of *Phytophthora* and *Pythium* species in irrigation water[J]. Plant Disease, 1991, 75(3): 305-311.
- [12] Klopmeier M J, Miller S A, Rittenburg J H, et al. Detection of *Phytophthora* in soybean soil by immunoassay analysis of infected bait[J]. Phytopathology, 1988, 52: 1576.

- [13] 窦坦德,李宝筠,沈崇尧.快速检测大豆疫霉菌的酶联免疫吸附技术研究[J].植物检疫,1997,11(3):138-142. (Dou T D, Li B T, Shen C R. Research on rapidly detecting *Phytophthora sojae* by ELISA[J]. Plant Quarantine, 1997, 11(3):138-142.)
- [14] 文景芝,张晓玲,辛敏.用多克隆抗体检测纯培养和植物体内的大豆疫霉菌[J].东北农业大学学报,2002,33(3):209-212. (Wen J Z, Zhang X L, Xin M. Polyclonal antibody-based immunoassay for detection of *Phytophthora sojae* in pure culture and in inoculated soybean seedlings[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2002, 33(3):209-212.)
- [15] 周肇蕙,严进,苏彦纯,等.大豆疫病的检疫研究一病原菌的分离鉴定[J].植物检疫,1995,9(5):257-261. (Zhou Z H, Yan J, Su Y C, et al. Research on quarantine of *Phytophthora sojae*-isolation and identification of pathogen[J]. Plant Quarantine, 1995, 9(5):257-261.)
- [16] Nygaard S L, Elliott C K, Cannon S J, et al. Isozyme variability among isolates of *Phytophthora megasperma* [J]. Phytopathology, 1989, 79: 773-780.
- [17] 文景芝.大豆疫霉根腐病菌检测鉴定方法及病害传播途径研究[D].哈尔滨:东北林业大学林学院,2001:45. (Wen J Z. Detection and identification of *Phytophthora sojae* and transmission of *Phytophthora* root rot of soybean[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2001: 45.)
- [18] Li S, Hartman G L. Molecular detection of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots and soil[J]. Plant Pathology, 2003, 52: 74-83.
- [19] Kong P, Hong C, Jeffers S N, et al. A species-specific polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Phytophthora nicotinae* in irrigation water[J]. The American Phytopathological Society, 2003, 93(7):822-831.
- [20] 陈宏宇,文景芝.大豆疫霉菌遗传多样性的 RAPD 分析[J].中国油料作物学报,2006,28(3):330-334. (Chen H Y, Wen J Z. Genetic diversity analysis of *Phytophthora sojae* by using RAPD [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2006, 28(3):330-334.)
- [21] 陈庆河,翁启勇,王源超,等.福建省大豆疫病病原鉴定及其核糖体 DNA-ITS 序列分析[J].植物病理学报,2004,34(2):112-116. (Chen Q H, Weng Q Y, Wang Y C, et al. Identification and sequencing of ribosomal DNA-ITS of *Phytophthora sojae* in Fujian [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(2):112-116.)
- [22] 王立安,张文利,王源超,等.大豆疫霉的 ITS 分子检测[J].南京农业大学学报,2004,27(3):38-41. (Wang L A, Zhang W L, Wang Y C, et al. Molecular detection of *Phytophthora sojae* using ITS-based PCR assay[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2004, 27(3):38-41.)
- [23] 陈长卿,康振生,王晓杰,等.大豆疫霉的分子检测[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(8):73-76. (Chen C Q, Kang Z S, Wang X J, et al. Molecular detection of *Phytophthora sojae*[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2005, 33(8):73-76.)
- [24] 秦旭升.运用 PCR-RFLP 标记检测南瓜疫病病菌[D].哈尔滨:东北农业大学农学院,2001:4. (Qin X S. Use of PCR-RFLP marker to detect *P. capsici* in Squash [D]. Harbin: Agronomy College of Northeast Agricultural University, 2001: 4.)
- [25] 袁凤杰,徐金星,杨庆凯.大豆灰斑病菌生理小种的同工酶鉴定[J].大豆科学,1998,17(3):219-223. (Yuan F J, Xu J X, Yang Q K. Isozyme analysis of *Cercospora sojina* Hara [J]. Soybean Science, 1998, 17(3):219-223.)

(上接第 500 页)

- [5] Ghadge S V, Raheman H. Biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil having high free fatty acids[J]. Biomass and Bioenergy, 2005, 28: 601-605.
- [6] Meher L C, Sagar D V, Naik S N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2006, 10: 248-268.
- [7] Hass M J. Improving the economics of biodiesel production through the use of low value lipids as feedstocks: vegetable oil soapstock [J]. Fuel Processing Technology, 2005, 86:1087-1096.
- [8] Freedman B, Pryde E H, Mounts T L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1984, 61:1638-1643.
- [9] Canakci M, Gerpen J V. Biodiesel production via acid catalysis[J]. Transactions of the American Society of agricultural engineers, 1999, 42:1203-1210.
- [10] Ma F, Hanna M A. Biodiesel production: a review[J]. Bioresource Technology, 1999, 70: 1-15.
- [11] Zullaikah S, Lai C C, Vali S R, et al. A two-step acid-catalyzed process for the production of biodiesel from rice bran oil[J]. Bioresource Technology, 2005, 96:1889-1896.
- [12] Haas M J, Bloomer S, Scott K. High-efficiency synthesis of fatty acid methyl esters from soapstock [J]. Journal of American Oil Chemists Society, 2000, 77: 373-379.
- [13] Haas M J, Michalski P J, Runyon S, et al. Production of FAME from acid oil, a byproduct of vegetable oil refining[J]. Journal of American Oil Chemists Society, 2003, 80: 97-102.
- [14] 徐桂转,刘会丽,张百良.响应面法优化酶催化酯交换反应研究[J].化学工程,2007,35(3):63-67. (Xu G Z, Liu H L, Zhang B L. Optimization of lipase-catalyzed transesterification by response surface methodology [J]. Chemical Engineering, 2007, 35(3):63-67.)