

现代生物技术在马铃薯晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 研究中的应用

邵铁梅¹, 朱杰华¹, 郑秀银²

(1. 河北农业大学植保学院, 河北 保定 071001; 2. 河北省唐山市出入境检验检疫局, 河北 唐山 063000)

摘要: 综述了同功酶、RFLP、PCR、RAPD、AFLP 的基本原理及其在晚疫病菌研究中的应用。主要包括以下 6 方面: ①绘制晚疫病菌的连锁图谱; ②分析一个地区晚疫病菌的基因结构及其变化; ③分析来自不同寄主的菌株基因结构的差异; ④研究晚疫病菌的来源; ⑤研究墨西哥以外地区 A2 交配型菌株的来源; ⑥研究有性生殖的发生情况。同时还展望了现代生物技术在晚疫病菌研究中的发展方向, 指出该研究领域国内与国外的差距及今后国内的研究方向。

关键词: 马铃薯晚疫病菌; 同工酶; RFLP; PCR; RAPD; AFLP

中图分类号: Q81, S532 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0092 (2002) 02-087-05

马铃薯晚疫病由致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 引起, 是世界马铃薯产区的毁灭性病害之一^[1], 1845 年该病在爱尔兰流行造成大饥馑。自那时起, 各国学者开始对马铃薯晚疫病及晚疫病菌进行研究。近几十年来随着分子生物学技术的发展, 这方面的研究也取得了很大进展, 对长期困扰各国学者的一些问题给出了满意的答复或作出了合理的推测, 如: 一个地区内的晚疫病菌基因结构如何, 是否随时间变化? 世界范围内的晚疫病菌是否有联系? 晚疫病菌发源地在何处? 墨西哥地区以外的 A2 交配型菌株是如何产生的? 有 A2 交配型的菌株同时存在, 有性生殖是否一定发生? 究竟是哪种基因型的晚疫病菌造成爱尔兰晚疫病的大流行, 它从何而来? 来自不同寄主的菌株是否有差别? 本文仅对现代生物技术在晚疫病菌生物学研究方面的应用进行简要综述。

1 同功酶、RFLP 技术在马铃薯晚疫病菌研究中的应用

1.1 同功酶及晚疫病菌中的同功酶

同功酶 (isoenzyme 或 isozyme) 是指同一机体中的一种酶存在多种分子形式, 它们具有同样的催化活性。它们的溶解度、分子量和对激活剂、抑制剂的反应都可能不同。同功酶的存在是一切生物体的普遍现象。同功酶可以用电泳与组织化学相结合的方法来进行鉴定。利用同功酶可以研究基因, 现在已成为生化遗传学上的重要内容。

晚疫病菌是二倍体真菌, 即在个体中每条染色体都由 2 个拷贝, Gpi (6-磷酸葡萄糖异构酶) 和 Pep (肽酶) 都是二聚体的酶, 只有当两个亚基结合在一起才有活性。通过, Gpi 和 Pep 的带型可区别晚疫病菌的基因型。纯合的基因型个体在凝胶上只有一条带。例: US-6 无性系的菌株的 Gpi 基因座 100/100, 在凝胶上只有一条带。杂合的基因型个体在凝胶上有三条带, 两条是同源二聚体的带, 另一条是异源二聚体带, 异源二聚体带迁移到两个

* 本项目为河北省自然科学基金资助项目 (300111)

收稿日期: 2002-02-02

邵铁梅 (1974-), 女, 河北徐水人, 河北农业大学植保学院在读研究生。

同源二聚体带之间。例: US-7 无性系的菌株的 Gpi 基因座 100/111, 染色后凝胶上会出现三条带, 100/100、100/111、111/111, 中间的一条是异源二聚体的带 100/111, 两条同源二聚体带 (111/111, 100/100) 一前一后。

1.2 RFLP 技术的原理

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 即限制性片段长度多态性。指利用不同的限制性内切酶在各自特定识别位点切割基因组 DNA, 会产生大量大小不等的 DNA 片段。这经限制性内切酶酶切后所表现的 DNA 片段的差异, 就是限制性片段长度多态性 (RFLP)。1976 年, 遗传学家 Grodzicker 等人首次描述了 DNA 限制性片段长度多态性, 1980 年, Bostein^[2] 提出用 RFLP 作为遗传标记构建连锁图谱的设想, 后又在构建人类遗传图谱的可能性上进行了讨论。RFLP 反映的是 DNA 水平上的差异, 而差异往往是由变异造成的, 变异分为单碱基突变型和结构重排型两大类。单碱基突变发生在限制性内切酶的位点上, 致使酶切位点增加或丢失而产生多态性, 这称为点多态性。结构重排型是指 DNA 序列内部发生了较大的变化, 如插入或缺失, 从而使酶切位点间的长度发生改变, 造成了片段长度的多态性。这些变异经酶切、分离、杂交、放射自显影就会使 RFLP 带的特征发生改变, 由此反应 DNA 水平上的差异, 对生物的变异进行分析。目前, 在晚疫病菌的研究中, DNA 指纹探针 RG57 至少可显示 25 条带^[3]。

1.3 同功酶技术和 RFLP 技术在马铃薯晚疫病菌研究中的应用

在晚疫病菌的研究中, RFLP 和同功酶技术可有效地用于群体遗传分化, 从而可对长期困扰各国学者的一些问题给出满意的答复或作出合理的推测。

1.3.1 一个国家或地区的致病疫霉菌种的基因结构及变化

Forbes^[4] 通过同功酶、RFLP 对采自厄瓜多尔的 302 个菌株进行分析, 其中 95% 以上的菌株属于 EC-1 无性系 (Gpi: 90/100 Pep⁹⁶/100; RFLP: 1111101001001101000111011; 交配型: A1), 其余的属于 US-1 无性系 (Gpi: 86/100 Pep⁻⁹²/100; RFLP 带型: 10111010110011010 -

00110011; 交配型: A1)。Sujkowski^[5] 通过同功酶和 DNA 指纹对 1985~1991 年采自波兰的 247 个菌株进行研究, 结果表明 1985~1987 年的菌株均属于 A1 交配型, 并且只有一个无性系 (包括三种基因型 PO-1, PO-2, PO-3), 到 1988 年该无性系菌株只占所采菌株的 54%, 1988 年以后再没有检测到该无性系的菌株, 且 1988 年检测到新的基因型 (PO-4), 从 1988~1991 年该基因型的发生频率一直在上升, 1991 年该基因型的菌株占所采菌株的 50%。

1.3.2 关于晚疫病菌的发源地问题

Goodwin 等^[6] 用同功酶、RFLP 等技术对墨西哥中部的晚疫病菌进行的研究表明, 当地的晚疫病菌最具多样性, 该地区的晚疫病菌群体含有全部已知的同功酶基因型和所有的 RFLP 带, 从而确认了 Readick^[7,8] 的假设, 即墨西哥中部是晚疫病菌的发源地。那么, 晚疫病菌又是如何从墨西哥蔓延到世界各地的, 各个地区间的晚疫病菌又有何联系? Goodwin 等^[9] 对采自 5 大洲 20 个国家的 300 个菌株用 RFLP、同功酶进行分析, 结果表明, US-1 无性系遍布四大洲。并将研究结果与晚疫病菌流行的重大历史事件^[10,11] 相联系, 推测晚疫病菌的首次全球性地迁移分三个阶段。第一阶段: 1842 年或 1843 年从墨西哥到美国东北部; 第二阶段: 约 1845 年, 只有一个无性系从美国到欧洲; 第三阶段: 从欧洲遍布全球。如果此推测成立, 爱尔兰 1845 年的马铃薯晚疫病大流行便只由一个无性系 (US-1) 造成。同时还发现, 美国和加拿大的菌株与墨西哥的菌株相比多样性较差, 表明晚疫病菌在迁移中经历了一个极度的基因障碍, 有明显的瓶颈效应。

1.3.3 墨西哥以外地区 A2 交配型的起源

19 世纪 50 年代在墨西哥首次发现 A2 交配型^[12], 1984 年瑞士报道发现 A2 交配型^[13], 继而好多国家相继报道发现 A2 交配型^[14,15], 那么, 墨西哥以外地区 A2 交配型从何处来? 当时有 4 种假说: ① A2 交配型在各地早就存在, 只是未被发现^[16]; ② 由墨西哥迁移而来^[17]; ③ 基因变异重组产生; ④ 由于自育和杀菌剂的刺激使菌株交配型发生变异而出现^[18]。Spielman^[17] 通过同功酶分析表明: 加拿大和日本境内的 A2 交配型菌株从墨西哥迁移而来。进而许多科学家支持迁移假说, 而

Ko^[18]曾用交配型变异假说反对迁移假说。Goodwin^[19]对已发表的基因型数据进行重新分析, 否定了交配型变异假说。那么 A² 交配型菌株又是如何迁移的? Fry 将晚疫病流行的重大历史事件^[20] 和多人研究结果相联系, 认为可能是通过带菌块薯从墨西哥传到西欧 (1970s), 继而从西欧通过带菌薯块传播到其他地区。

1.3.4 有性生殖的发生情况

对采自一个国家或地区 A² 交配型出现前后的大量菌株进行交配型、同功酶基因型、DNA 多态性进行分析, 比较 A² 交配型出现前后菌株的多态性有无剧烈变化, 如果有, 而且一些基因座的基因型在种群中的分配符合 Hardy-weinberg 平衡, 可能当地有有性生殖发生。Ander^[21] 和 Suikowski^[5] 分别对荷兰和波兰的菌株交配型、同功酶基因型、DNA 多态性进行分析, 结果表明, 在荷兰和波兰都可能发生有性生殖。

1.3.5 比较来自于不同寄主^[22,23] 的晚疫病病菌之间群体遗传结构的差异^[24]

在厄瓜多尔^[25] 所有采自马铃薯的菌株都与 EC-1 (Gpi: 90/100; Pep96/100; RFLP: 111110-1001001101000111011; 交配型: A1) 同功酶基因型、表现型、交配型一样; 而几乎所有的番茄菌株具有 US-1 (Gpi: 86/100; Pep92/100、RFLP 带型: 10111-01011001101000110011、交配型: A1) 的特征。在菲律宾^[24] 所有采自番茄的菌株都是 US-1.1, 与马铃薯菌株有明显区别。

2 PCR、RAPD 在马铃薯晚疫病病菌研究中的应用

2.1 PCR、RAPD 技术的原理

PCR (Polymerase Chain Reaction) 聚合酶链式反应, 是 1985 年美国 Cetus 公司人类遗传研究室的科学家 Mullis^[26] 及加州大学洛杉矶分校和 Howghes 医院等联合研制的一种在体外快速扩增特定基因或 DNA 序列的方法。基本原理, 双链 DNA 高温变性成两条单链, 这两条单链作为模板与引物在低温下退火, 于适温下由 DNA 聚合酶催化利用反应混合物中的四种脱氧核苷三磷酸沿引物延伸, 合成新 DNA 互补链, 并按变性、退火、延伸三个步骤循环进行, 上一个循环中形成的新链又可作为

下一个循环合成的模板, 从而使 DNA 序列的产量随循环次数呈指数增加。

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNAs) 即随机扩增多态性 DNA, 是由 Willams^[27] 等于 1990 年发展起来的一项新的分子标记技术, 其技术的本质是 PCR 反应。原理: 用一个随机的寡聚核苷酸序列 (10 个寡聚核苷酸), 以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。生物中 RAPD 标记产生的原因: 一种可能是核苷酸的改变而引发引物的错配; 另一种可能是与引物配对的位点因核苷酸的插入、缺失等而缺失, 使本来可以产生的 PCR 产物消失; 再一种可能是因插入或缺失使 PCR 产物本身大小发生改变。这些类型的改变使 RAPD 标记能适于研究生物的遗传多样性及生物的遗传关系, 进行遗传作图, 用 DNA 指纹研究群体遗传学。

2.2 PCR 技术和 RAPD 技术在晚疫病病菌研究中的应用

运用 PCR 技术可测定 MtDNA (线粒体 DNA) 表型。MtDNA (线粒体 DNA) 表型与其他表型有关系: MtDNA 表型为 I b 的菌株通常有与 US-1 无性系菌株一样的是交配型为 (A1), 同功酶基因型 (Gpi 86/100, Pep 92/100) 和 RFLP 带型。Phytophthora infestans 的 MtDNA 序列已知, 四种表型的限制性位点也已被定位在 MtDNA 上, 已经可以用两对寡聚核苷酸引物扩增 MtDNA 发生多态性的区段, 再经酶切电泳可区分四种 MtDNA 表型: I a、I b、II a、II b^[28]。虽然 MtDNA 表型还未被认为是晚疫病病菌的一种标记, 但了解菌株的 MtDNA 表型可以帮助监测晚疫病病菌种群。

PCR 技术还可用于测定菌株的交配型^[29], S1 是与 A1 (决定交配型的等位基因) 连锁的基因座, 用引物 S1A 和 S1B 可扩增出一条与 S1 对应的约长为 1250 个 bp 的 DNA 片段。它代表一个串联重复序列, 这个重复序列在 A1 交配型菌株中存在, 在 A² 交配型菌株中不存在, 通过此片段的有无来判断菌株的交配型。不需对菌株进行纯培养, 可在短时间内测定菌株的交配型, 加快研究进程。

RAPD 技术在晚疫病病菌中多用于研究种内群体遗传分析。如: Mahuku^[30] 对 1994~1996 年采自加拿大的 141 个菌株进行 RAPD 分析, 将其分为

21 个组, 分析表明 97% 的变异来自于种群内, 3% 的变异来源于种群间。

3 AFLP 在马铃薯晚疫病病菌研究中的应用

3.1 AFLP 技术的原理

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 技术是 1993 年由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos^[31] 发展起来的一种检测 DNA 多态性的新方法, 该方法结合了 RFLP 技术和 RAPD 技术的特点。其选择扩增的原理: 首先用限制性内切酶彻底消化基因组 DNA, 产生粘性末端。使用人工合成的带有同样内切酶识别的粘性末端的短的双链作为接头, 接头与 DNA 片段互补连接后成 DNA 模板。接头序列以及与其相连的限制位点作为随后进行的限制性片段扩增的引物结合位点。扩增片段通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离检测。

3.2 AFLP 技术的应用

目前, AFLP 技术主要用于构建晚疫病病菌的基因连锁图谱。1997 年, Van de Lee^[32] 等完成了一张比较完整的致病疫霉基因连锁图谱, 这张图谱包括 183 个 AFLP 标记, 7 个 RFLP 标记和交配型基因座, 包括 10 个主要的连锁群和 7 个次要的连锁群, 共覆盖 827 cm, 并证明主要连锁群中的标记来自于两个亲本, 而次要连锁群中的标记来自 AI 交配型的亲本或来自 A2 交配型的亲本。同时还证明了致病疫霉是同核型的二倍体。AFLP 带型在分裂中能够保持稳定, 并遵循孟德尔遗传规律。交配型及其所在的连锁群的其他标记均不遵循孟德尔遗传规律。AFLP 技术用于构建基因连锁图谱, 使我们从基因水平了解晚疫病病菌, 为更好的研究晚疫病病菌、防治晚疫病提供理论依据。

4 展望

随着现代分子生物学技术的发展, 对晚疫病病菌的研究已有了很大进展, 但还存在着问题。

(1) 构建饱和的遗传标记连锁图谱。据估计致病疫霉的基因约为 250 Mb^[33], 基因长度约为 1010~1300 cm^[34]。现已完成的标记覆盖了基因组的 69%。今后这项工作还将继续进行, 利用各种标记技术, 对晚疫病病菌的连锁图谱进行完善。只有这样, 才能使两个标记间的距离足够小, 使一些性

状基因借助于高密度的标记进行准确定位、基因克隆, 进而进行抗病育种研究

(2) 运用分子标记寻找与目的基因紧密连锁的标记, 如在致病疫霉中找到与其抗瑞毒霉基因连锁的标记, 我们便可利用这一标记对一个新的小种进行抗药性测定, 从而指导防治; 如发现与毒力基因紧密连锁的基因标记, 可使我们进一步了解马铃薯晚疫病病菌的致病机制, 从而可在该病的防治方面有大的突破。若找到与无毒基因紧密连锁的基因标记, 我们可以对无毒基因进行准确定位, 进而克隆无毒基因, 并利用转基因技术进行马铃薯的抗病育种。

在我国用分子生物学研究晚疫病病菌生物学还是空白, 以后的研究应与世界接轨, 主要有以下几个方向: 搞清我国马铃薯晚疫病病菌的基因结构, 并对其变化进行监测; 弄清我国的晚疫病病菌从何地迁移而来; 我国的 A2 交配型菌株从何地迁移而来; 我国境内的晚疫病病菌是否有有性生殖发生; 晚疫病病菌的寄主特异性, 构建晚疫病病菌的遗传标记的连锁图谱等。在我国, 同工酶、RFLP、PCR、RAPD、AFLP 等技术都已比较成熟, 在生物领域应用也比较广泛, 我们应进一步将其应用到晚疫病病菌的研究中。

参 考 文 献

- [1] Hooker W J. 1981. Compendium of Potato Diseases. American Phytopathology Society. St. Paul, MN.
- [2] Bostein D, White T L, Skolnick M, Davis TW. Construction of a genetic linkage map in man using Restriction Fragment Length Polymorphisms. Am J Hum Genet, 1980, 32: 314-331.
- [3] Forbes G A, Goodwin S B, Drenth A, Oyarzun P, Ordonez M E., and Fry W E. A Global Marker Database for Phytophthora infestans. Plant Disease, 1998, 82: 811-818.
- [4] Forbes G. A., Escobar, X. C., Ayala, C. C., Revelo, J., Ordonez, M. E., Fry, B. A, Doucett, K., and Fry W. E. Population Genetic Structure of Phytophthora infestans in Ecuador. Phytopathology, 1997, 87: 375-380.
- [5] Sujkowski, L. S., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., and Fry, W. E. Increased Genetic Diversity via Migration and Possible Occurrence of Sexual Reproduction of Phytophthora infestans in Poland. Phytopathology, 1994, 84: 201-207.
- [6] Goodwin, S. B., Spielman, L. J., Matuszak, J. M., Bergeron, S. N., and Fry, W. E. Clonal Diversity and Genetic Differentiation of Phytophthora infestans populations in Northern and Central Mexico. Phytopathology, 1992, 82:

9—55—961.

- [7] Reddick, D. Whence came *Phytophthora infestans*? *Chronica Botanica*, 1939, 5; 410—412.
- [8] Reddick, D. Development of Blight Immune varieties. *American Potato Journal*, 1943, 20; 118—126.
- [9] Goodwin, S. B., Cohen, B. A., and Fry W. E. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91; 11591—115—95.
- [10] Stevens, N. E. *J. Wash. Acad. Sci.* 1933, 23, 435—446.
- [11] Bourke, P. M. *A. Nature (London)*, 1964, 203; 805—808.
- [12] Niederhauser, J. S. The blight, the blighter, and the blighted. *Trans. NY. Acad. Sci. Ser II*, 1956, 19; 55—63.
- [13] Hohl, H. R., and Iselin, K. Strains of *Phytophthora infestans* with A² mating type behaviour. *Trans. Br. Mycology Soc.* 1984, 83; 529—530.
- [14] Fry, W. E., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Matuszak, J. M., Drenth, A., Tooley, P. W., Sujkowski, L. S., Koh, Y. J., Cohen, B. A., Spielman, L. J., Inglis, D. A. and Sandlan, K. P. Historical and recent migration of *Phytophthora infestans*: Chronology, Pathway, and Implication. *Plant Disease*, 1993, 77; 653—661.
- [15] Goodwin, S. B. The population genetics of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 1997, 87; 462—473.
- [16] Shaw, D. S. 1987. The breeding system of *Phytophthora infestans*; The role of A² mating type. Pages 161—174. in *Genetics and Plant Pathogenesis*. P. R. Day and G. J. Jeiliss, eds. Blackwell Scientific Publications Oxford.
- [17] Spielman, L. J., Drenth, A., Davidse, L. C., Sujkowski, L. J., Gu, W. K., Tooley, P. W., and Fry, W. E. A Second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*? *Plant pathology*, 1991, 40; 422—430.
- [18] Ko, W. H. An alternative possible origin of the mating type In *Phytophthora infestans* outside Mexico. *Phytopathology*, 1994, 84; 1224—1227.
- [19] Goodwin, S. B., Drenth, A. Origin of the A² Mating Type of *Phytophthora infestans* Outside Mexico. *Phytopathology*, 1997, 87; 992—999.
- [20] Niederhauser, J. S. 1991. *Phytophthora infestans*; The Mexico connection. Pages: 25—45 In: *Phytophthora*. Lucas, J. A., Shattock, R. S., Shaw, D. S. and Cooke, eds. Cambridge University Press, England.
- [21] Drenth, Inge C. Q. TAS and Francine Govers. DNA Fingerprint Uncover a New Sexually Reproducing Population of *Phytophthora infestans* In the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 100; 97—107. 1994.
- [22] Erselius, L. J., Vega-Sanchez, M. E., Rodriguez, A. M., Barillas, O., Hohl, H. R., Quiambo, P. S., Mukalazi, J., Vermeulen, T., Fry W. E., and Forbes, G. A. 1998. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Uganda and Kenya. *CIP Program Report 1997—1998*, 49—55.
- [23] Erselius, H. R., Hohl, M. E., Ordonez, P. J., Oyarzun, F., Jarriin, A., Velasco, M. P., Ramon, and G. A. Forbes. Genetic Diversity among Isolates of *Phytophthora infestans* from Various Hosts in Ecuador. Impact on a changing World Program Report, 1997—1998, 39—48.
- [24] Koh, Y. J., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Cohen, B. A., Ogoshi, A., Sato, N. and Fry, W. E. Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian Countries. *Phytopathology*. 1994, 84; 922—927.
- [25] Oyarzun, P. J., Pozo, A., Orsonez, M. E., Doucett, K., and Forbes, G. A. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. *Phytopathology*. 1998, 88; 265—271.
- [26] Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of CAN In vitro; the polymerase chain reaction [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986, 51; 263—273.
- [27] Williams, J. G. K. Kubelik, A. R. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18; 6531.
- [28] Gareth W. Griffith, and David S. Shaw. Polymorphisms In *Phytophthora infestans*: Four Mitochondrial Haplotypes Are Detected after PCR Amplification of DNA from Pure Cultures or From Host Lesions. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 10; 4007—4014.
- [29] Judelson H S. Chromosomal Heteromorphism Linked to the Mating Locus of the Oomycete *Phytophthora infestans*. *Mol Genet* 1996, 252; 155—161.
- [30] G. Mahuku, R. D. Peters, H. W. Plattff and F. Daayf. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Phytophthora infestans* Isolate Collection in Canada during 1994 to 1996. *Plant Pathology*, 2000, 49; 252—260.
- [31] Van der Lee, T., Ijgke De Witte, Drenth, A., Alfonsio, C., and Govers, F. AFLP Linkage map of the Oomycete *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology*. 1997, 21; 278—291.
- [32] Zabeau M et al. European patent [P] 0535 858A1, 1993—03—31.
- [33] Tooley, P. W., and Therrien, C. D. Cytophotometric determination of the nuclear DNA content of 23 Mexican and 18 non-Mexican isolate of *Phytophthora infestans*. *Exp Mycol*. 1987, 11; 19—26.
- [34] Hulbert, S. T., Ilott, T. W., Legg, E. J., Lincoln, S. E., Lande-r, E. S., and Michelmore, R. W. Genetic analysis of the fungus, *Brimia lactucae*, using Restriction Fragment Length Polymorphism. *Genetics*, 1988, 120; 947—958.