



Técnicas moleculares clásicas para la diferenciación de formas especiales de *Fusarium oxysporum*

Classical molecular techniques for differentiation of special forms of *Fusarium oxysporum*

¹Ilobana Alanis-Martínez, ²Carmen Medina-Mendoza, ¹Nahum Marbán-Mendoza, ²Ernestina Valadez-Moctezuma

¹Departamento de Parasitología Agrícola
y ²Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México

RESUMEN

La caracterización y diferenciación de formas especiales de *Fusarium oxysporum* mediante análisis de polimorfismos genéticos es más apropiado que solo considerar caracteres morfológicos o fisiológicos. Actualmente se han desarrollado técnicas moleculares sofisticadas para estimar variación genética, diferenciar o identificar microorganismos, tales como las basadas en secuenciación de segunda generación, pero éstas aún tienen altos costos y no son accesibles para muchos laboratorios que requieren diagnosticar o diferenciar a un determinado fitopatógeno. En este trabajo se compararon tres técnicas moleculares clásicas: RAPD, MP-PCR y RAMPnr con la finalidad de diferenciar aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y *F. oxysporum* f. sp. *coffeeae*. Estas técnicas detectaron polimorfismos entre las formas especiales de *Fusarium* e incluso entre los genotipos de *F. o.* f. sp. *lycopersici*. Los agrupamientos representados en los dendrogramas, indican que *F. oxysporum* es muy diverso y que las formas especiales analizadas son genéticamente diferentes. Estas técnicas proporcionan un procedimiento simple, rápido y de bajo costo para la caracterización y posterior identificación rutinaria de patógenos.

PALABRAS CLAVE: MP-PCR, RAMPnr, RAPD, patógeno, polimorfismo.

ABSTRACT

The characterization and differentiation of special forms of *Fusarium oxysporum* by analysis of DNA polymorphisms are more appropriate than just considering morphological or physiological characteristics. Currently, they have developed sophisticated molecular techniques to estimate genetic variation, differentiate or identify microorganisms, such as those based on second-generation sequencing, but they still have high costs and are not accessible to many laboratories that require diagnose or differentiate a particular plant pathogen. In this paper, three classical molecular techniques were compared: RAPD, MP-PCR and RAMPnr in order to differentiate isolates of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and *F. oxysporum* f. sp. *coffeeae*. These techniques detected polymorphisms between the special forms of *Fusarium* and even between genotypes of *F. o.* f. sp. *lycopersici*. The groups represented in dendrograms indicate that *F. oxysporum* is very diverse and that special forms analyzed are genetically different. These techniques provide a simple, fast and inexpensive routine procedure for the characterization and subsequent pathogen's identification

KEYWORDS: MP-PCR, RAMPnr, RAPD, pathogen, polymorphism.

Recibido / Received: 27/02/ 2014

Aceptado / Accepted: 28/10/2015

Autor para correspondencia / Corresponding author:

Ernestina Valadez-Moctezuma
evaladez@correo.chapingo.mx

INTRODUCCIÓN

Fusarium oxysporum Schlechtend.:Fr es un complejo de especies económicamente importante, porque causa daños a una amplia variedad de cultivos agrícolas (Baayen *et al.*, 2000). Se han descrito más de 150 formas especiales que se caracterizan por presentar propiedades fisiológicas que le otorgan la especialización patogénica a determinadas especies, géneros o grupos de plantas (Arbeláez, 2000; Baayen *et al.*, 2000); por lo que se ha asumido que están altamente relacionadas y presentan morfología similar aún cuando pertenecen a diferentes grupos biológicos (Kistler, 1997).

Los marcadores moleculares han sido eficientes en el estudio de la diversidad genética de fitopatógenos (Baysal, 2013) y en la identificación de formas especiales (Baysal, 2009). Algunas técnicas utilizadas para determinar la diversidad genética del género *Fusarium* son RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Bentley, 1998), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats) y actualmente la secuenciación de porciones o genes completos (Wulff *et al.*, 2010; Geiser *et al.*, 2004; Kristensen *et al.*, 2005). La técnica RAPD ha sido empleada para el estudio de formas especiales, razas y aislamientos con diferentes patotipos de *Fusarium oxysporum* (Kelly *et al.*, 1998, Luna *et al.*, 2004), ya que reduce el tiempo necesario para la caracterización y provee información genética. La técnica MP-PCR (Microsatellite Primed-PCR) y RAMPnr (non radioactive Random Amplified Microsatellite Polymorphism) fueron utilizadas por Valadez *et al.* (2005) como una opción para la detección de perfiles de ADN más abundantes e informativos, ofreciendo mayor estabilidad y cantidad de huellas. Actualmente existen técnicas sofisticadas basadas en secuenciación de segunda generación para el estudio de la diversidad genética de *Fusarium* y de otros organismos, pero éstas aún tienen altos costos. Es por ello que este trabajo tuvo como objetivo utilizar técnicas moleculares clásicas para diferenciar de forma rápida cuatro formas especiales de *Fusarium oxysporum*: f. sp. *ciceris*, f. sp. *radicis-lycopersici*, f. sp. *lycopersici* y f. sp. *coffeeae*, los cuales pertenecen a un género de hongos fitopatógenos que morfológicamente no es posible distinguir. El conocimiento de las diferencias entre este tipo de patógenos es importante para su adecuado control, además de que estas técnicas consumen poco tiempo, proporcionan resultados confiables y son de bajo costo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos

Se emplearon cuatro aislamientos por duplicado de formas especiales de *Fusarium oxysporum*: dos cepas (f. sp. *lycopersici* y f. sp. *radicis-lycopersici*.) procedentes de la colección de hongos fitopatógenos del Colegio de Postgraduados (Montecillos), Estado de México. La f. sp. *ciceris* se aisló de plantas de garbanzo con síntomas de marchitez de la zona del Bajío y la f. sp. *coffeeae* se aisló de plantas de café con corchosis en la raíz, procedentes del estado de Veracruz. Los hongos se cultivaron en medio PDA (150g de papa, 10g de dextrosa, 18g de agar y 4 gotas de ácido láctico (25%, MERCK); se desarrollaron cultivos monóspóricos, los cuales fueron cultivados en medio líquido Czapeck-Dox (30g de sacarosa, 2g NaNO₃, 0.1g K₂HPO₄, 0.5g MgSO₄ 7H₂O, 0.5g KCL, 0.01g FeSO₄ 7H₂O) para extracción de ADN.

Extracción de ADN

Se utilizó el método reportado por Kelly *et al.* (1994). La calidad de la molécula se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% y se cuantificó mediante espectrofotometría. Por cada forma especial se emplearon dos genotipos procedentes del mismo aislamiento, pero de conidio diferente: *Fusarium oxysporum* f. sp. *coffeeae* A, *coffeeae* B, *ciceris* A, *ciceris* B, *radicis-lyco* A, *radicis-lyco* B, *lycopersici* A, *lycopersici* B y una planta de garbanzo como grupo comparativo.

RAPD

Para el análisis de huellas aleatorias de ADN, se seleccionaron siete iniciadores de la serie C (05, 08, 09, 14, 16, 18 y 19) de la Casa comercial Carl Roth GMBH. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL con 80 ng de DNA, 20 pmoles de iniciador, amortiguador de reacción 1X, 200 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂ y 2U *Taq* ADN polimerasa. La amplificación se llevó a cabo con las siguientes condiciones: 94 °C, 1min, 38 ciclos [94 °C, 30 s; 35 °C, 30 s; 72 °C, 1.5 min] y 72 °C, 2.5 min de extensión final en un termociclador Perkin Elmer 480.

MP-PCR

Para esta técnica se emplearon cinco iniciadores complementarios a microsatélite: [GGAT]₄, [GACA]₄, [GATA]₄, [CT]₈ y [CA]₈



de Gibco-BRL. La mezcla de reacción de 25 μ L contenía 50 ng de ADN; 20 pg del iniciador, amortiguador de reacción 1X, 200 μ M dNTPs, 3 mM $MgCl_2$ y 1.5 U *Taq* ADN polimerasa. Las condiciones de termociclaje fueron las siguientes: 93 °C, 1 min; 40 ciclos [93 °C, 2 s; 40 °C, 1 min para [GATA]₄ y 48 °C 1 min para [GGAT]₄, [GACA]₄, [CT]₈ y [CA]₈]; 72 °C, 20 s y 72 °C por 6 min de extensión final.

RAMPnr

Esta técnica consiste en la combinación de dos tipos de iniciadores en cada reacción, uno para microsátélites y otro aleatorio, ambos sin marcaje (Valadez *et al.*, 2005). Se utilizaron seis pares de iniciadores: [GACA]₄+C05; [GACA]₄+C19; [GATA]₄+C05; [GATA]₄+C19; [CT]₈+C05 y [CT]₈+C19. El volumen final de reacción también fue de 25 μ L y contenía 80 ng de ADN, 10 pg de cada iniciador, amortiguador de reacción 1X, 200 μ M dNTPs, 3 mM $MgCl_2$ y 1.5 U *Taq* ADN polimerasa. Los productos de amplificación para las tres técnicas utilizadas se separaron en geles de agarosa Ultra Pure™ de GIBCO BRL 1.2, 1.4 y 2 % respectivamente, se tiñeron con bromuro de etidio 10 min y se documentaron con la cámara Kodak Digital Science 1D 2.0.

Análisis estadístico

Las huellas de ADN obtenidas se codificaron en una matriz binaria, a partir de la cual se construyó una matriz de similitud con el programa NTSyS pc.2.0 y el coeficiente de similitud Dice. Para el análisis de conglomerados se utilizó el método del promedio aritmético de pares no ponderados (UPGMA). Se obtuvieron los valores de correlación cofenética y por último se utilizó el programa WinBoot para obtener los valores del Bootstrapping con 5000 replicaciones. En el análisis se incluyó al garbanzo con el fin de contrastar los agrupamientos.

RESULTADOS

Características morfológicas

Las formas especiales de *F. oxysporum* cultivadas en medio PDA desarrollaron abundante micelio de distintas tonalidades que van desde violeta tenue hasta rojo intenso, lo cual ha sido reportado previamente por Seifert (2001). La forma especial

lycopersici presentó micelio escaso a diferencia de las formas especiales restantes.

Análisis molecular

RAPD

El ADN obtenido con la técnica empleada fue de buena calidad y de cantidad adecuada para el análisis molecular propuesto. Las huellas genómicas obtenidas con los distintos iniciadores RAPDs presentaron polimorfismos entre las formas especiales y entre los genotipos de la f. sp. *lycopersici* (Figura 1). En el dendograma se conformaron seis grupos con un coeficiente de similitud de 0.7 (Figura 5). La técnica considera idénticos a los genotipos de la f. sp. *coffea* con una confiabilidad del 100% al igual que a la f. sp. *ciceris*. Para en el caso de la f. sp. *radicis-lycopersici*, los dos aislamientos no se mantienen juntos como se esperaba; lo que sugiere contaminación en los aislamientos iniciales. El genotipo *lycopersici* A se relaciona con los genotipos de la f. sp. *radicis-lycopersici* a una distancia aproximadamente de 0.57 y confiabilidad del 99.9%. El genotipo *lycopersici* B se mantiene fuera del agrupamiento, relacionándose con las otras formas especiales a una distancia de 0.05 y una confiabilidad del 98.4%, lo que indica que este genotipo presenta un nivel de asociación muy bajo. El garbanzo se mantiene fuera del agrupamiento de *Fusarium*. El valor del coeficiente de correlación cofenética fue de $r = 0.98$, lo que indica muy buen ajuste.

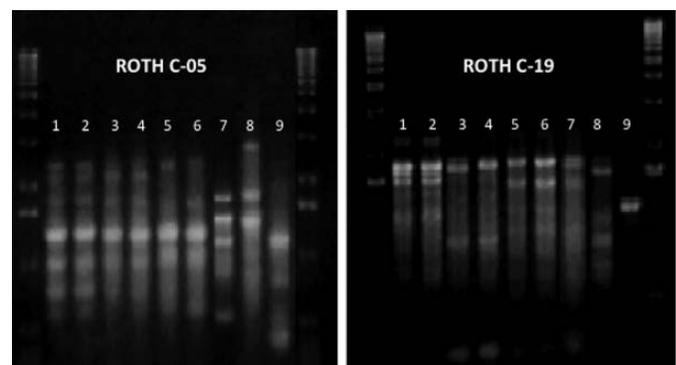


Figura 1. Huellas de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *coffea* (1 y 2), *F. o. f. sp. ciceris* (3 y 4), *F. o. f. sp. radicis-lycopersici* (5 y 6), *F. o. f. sp. lycopersici* (7 y 8) y 9 (garbanzo) amplificadas con la técnica RAPD con los iniciadores ROTH-C05 y ROTH-C-19. El Marcador de peso molecular es de 1kb.

MP-PCR

Con esta técnica se detectaron pocos datos y también pocos polimorfismos; pero abundantes barridos (característica propia de la técnica) entre las cuatro formas especiales. El iniciador [GGAT]₄ detectó cambios a nivel de ADN entre los genotipos de la f. sp. *radicis-lycopersici* (Figura 2) y [GACA]₄ mostró diferencias entre los genotipos de la f. sp. *Coffeae* (datos no mostrados). Con el dendrograma generado a partir de la codificación de 35 datos, se identificaron cinco grupos a una distancia de 0.67 (Figura 6). La técnica consideró como idénticos a los genotipos de la f. sp. *ciceris* con una confiabilidad del 94.4%. Los genotipos de la f. sp. *coffea* se relacionaron con una distancia de 0.77 y confiabilidad de 98.5%. El genotipo *lycopersici A* se agrupó con los dos genotipos de la f. sp. *radicis-lycopersici*. El genotipo *lycopersici B* se relaciona con el resto de las formas especiales a una distancia de 0.04 y confiabilidad del 52.2%. El garbanzo se asocia con el resto de los genotipos a una distancia de 0.06 y confiabilidad de 46.5%. El valor de correlación cofe-nética fue de $r = 0.95$, valor que indica muy buen ajuste.

RAMPnr

Con esta técnica las huellas de ADN obtenidas fueron más abundantes y definidas con respecto a las dos técnicas anteriormente descritas. También detectaron polimorfismos entre las

cuatro formas especiales y entre los genotipos de f. sp. *lycopersici* con los seis pares de iniciadores utilizados (Figuras 3 y 4). El dendrograma se construyó con 150 datos, identificando a seis grupos con un coeficiente de 0.99 (Figura 7). Esta técnica consideró a los genotipos *coffea A-coffea B*, así como a *ciceris A-ciceris B* como idénticos con una confiabilidad del 100%. A los

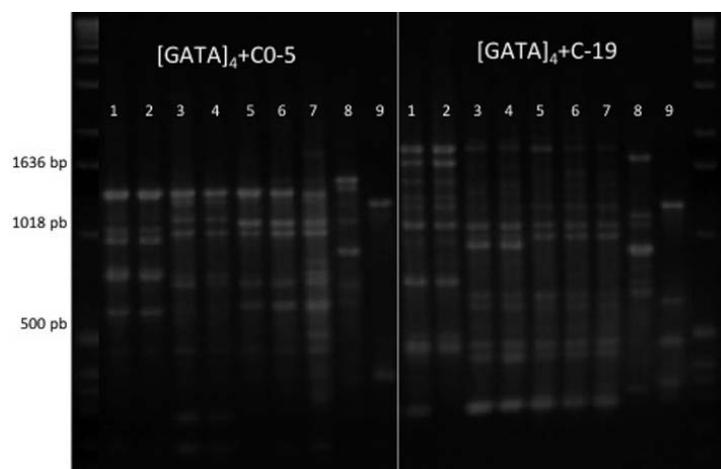


Figura 3. Huellas de ADN de *F. oxysporum* f. sp. *coffea* (1 y 2), *F. o. f. sp. ciceris* (3 y 4), *F. o. f. sp. radicis-lycopersici* (5 y 6), *F. o. f. sp. lycopersici* (7 y 8) y garbanzo (9) amplificadas con la técnica RAMPnr con los pares de iniciadores [GATA]₄ más C-05 y [GATA]₄ más C-19. El Marcador de peso molecular es de 1kb.

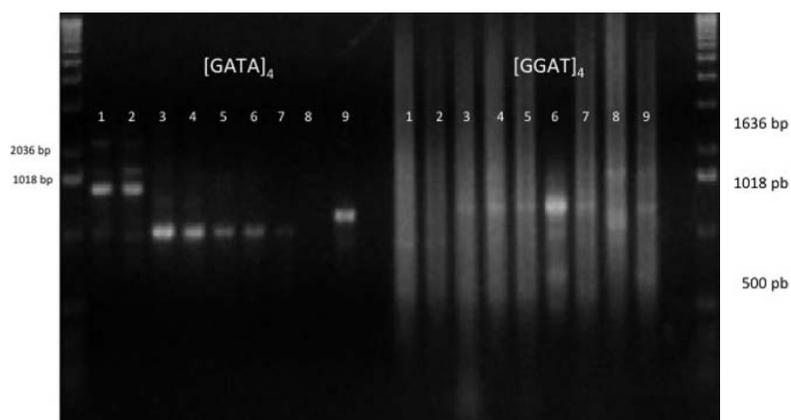


Figura 2. Huellas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *coffea* (1 y 2), *F. o. f. sp. ciceris* (3 y 4), *F. o. f. sp. radicis-lycopersici* (5 y 6), *F. o. f. sp. lycopersici* (7 y 8) y garbanzo (9) obtenidas con la técnica MP-PCR con los iniciadores [GATA]₄ y [GGAT]₄. El Marcador de peso molecular es de 1kb.

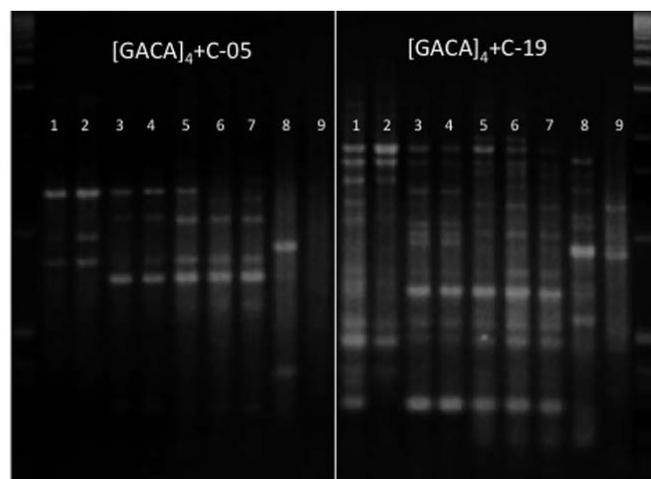


Figura 4. Huellas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. *coffea* (1 y 2), *F. o. f. sp. ciceris* (3 y 4), *F. o. f. sp. radicis-lycopersici* (5 y 6), *F. o. f. sp. lycopersici* (7 y 8) y garbanzo (9) amplificadas con la técnica RAMPnr con los pares de iniciadores [GACA]₄ más C-05 y [GACA]₄ más C-19. El Marcador de peso molecular es de 1kb.

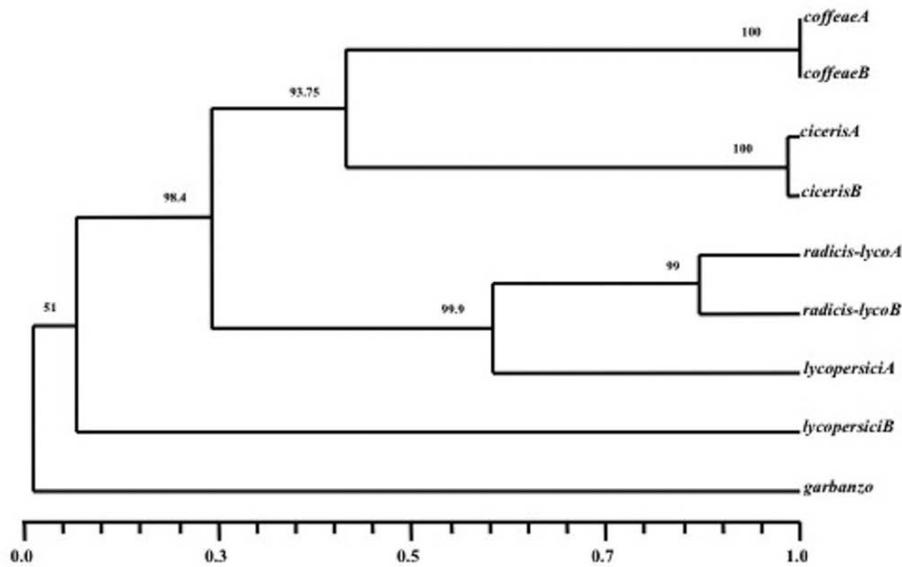


Figura 5. Relación genómica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *coffae*, *F. o. f. sp. ciceris*, *F. o. f. sp. radicis-lycopersici* y *F. o. f. sp. lycopersici* determinada con huellas de ADN tipo RAPD. El dendrograma se construyó con el programa NTSYS 2.0, con el coeficiente Dice y el método de agrupamiento UPGMA con 118 datos obtenidos con 7 iniciadores aleatorios. Los números sobre los nodos representan porcentaje de distancia determinado con Bootstrapping con 5000 repeticiones.

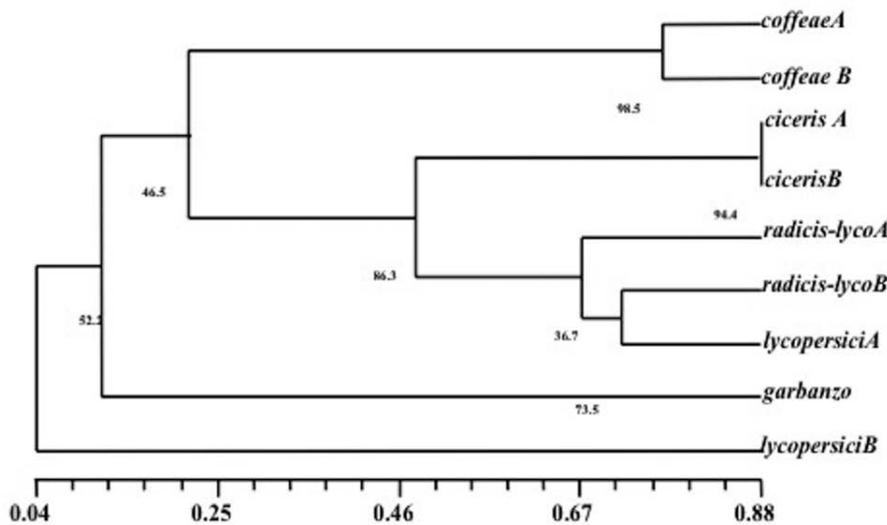


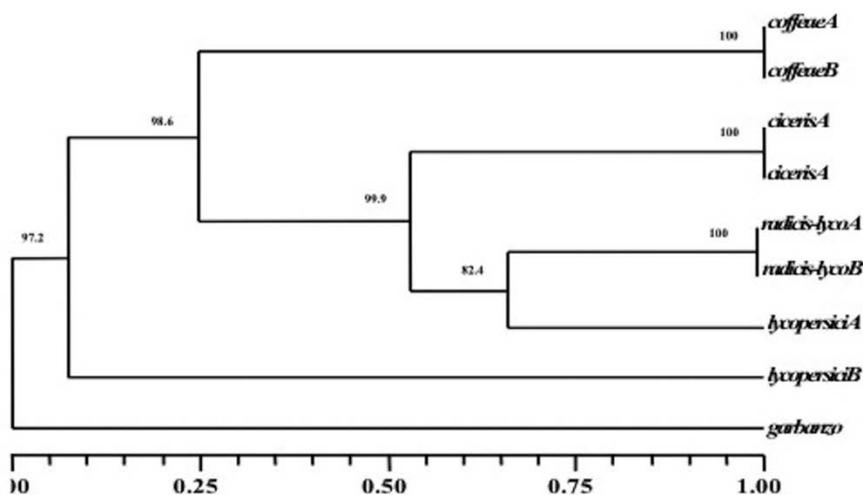
Figura 6. Relación genómica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *coffae*, *F. o. f. sp. ciceris*, *F. o. f. sp. radicis-lycopersici* y *F. o. f. sp. lycopersici* determinada con huellas de ADN tipo MP-PCR. El dendrograma se construyó con el programa NTSYS 2.0, con el coeficiente Dice y el método de agrupamiento UPGMA con 35 datos obtenidos con 5 iniciadores para MP-PCR. Los números sobre los nodos representan porcentaje de distancia determinado con Bootstrapping con 5000 repeticiones.

dos genotipos de la f. sp. *radicis-lycopersici* los relaciona a una distancia de 0.99 y confiabilidad del 100% y a su vez se relacionan con el genotipo *lycopersici A* a una distancia 0.66 con una confiabilidad del 82.4%. El genotipo *lycopersici B* se relaciona con el resto de los genotipos a una distancia de 0.08 con una confiabilidad de 97.2% lo que indica, una menor relación con el resto de las formas especiales (Figura 9). El garbanzo se mantiene fuera del agrupamiento. El valor de correlación cofenética fue de $r=0.99198$ que representa un buen ajuste.

DISCUSIÓN

Con las técnicas moleculares utilizadas y comparadas RAPD, MP-PCR y RAMPnr, se observaron diferencias claras en los patrones de bandas de las cuatro formas especiales: *F. oxysporum* f. sp. *coffae*, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, lo cual indica que existen diferencias genéticas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Vakalounakis y Fragkiadakis (1999) quienes establecieron diferencias genéticas por medio de

Figura 7. Relación genómica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cofeae*, *F. o.* f. sp. *ciceris*, *F. o.* f. sp. *radicis-lycopersici* y *F. o.* f. sp. *lycopersici* obtenida con la técnica RAMPnr. El dendograma se construyó con el programa NTSYS 2.0, con el coeficiente Dice y el método de agrupamiento UPGMA con 150 datos moleculares. Los números sobre los nodos representan porcentaje de distancia determinado con Bootstrapping con 5000 repeticiones.



RAPD entre las formas especiales: *cucumerinum* y *radicis-cucumerinum*.

Al comparar los agrupamientos de las tres técnicas, los resultados se muestran similares, pero los genotipos *lycopersici* se mantienen separados entre sí, lo que sugiere que existe variabilidad genética entre la misma forma especial, o que posiblemente está contaminada desde su aislamiento original, que es lo más probable. También se observa la separación entre el genotipo *lycopersici B* y los dos genotipos de *radicis-lycopersici*, lo cual puede deberse a variación molecular a nivel de ADN entre estas formas especiales (Kistler *et al.* 1987, Kuninaga y Yokosawa 1989). Los polimorfismos detectados en este tipo de hongos indican que existen fuentes de variabilidad genética entre sí, debido a que tienen un origen polifilético (O'Donnell, *et al.*, 1998; Baayen *et al.*, 2000). Por otro lado, el genotipo *lycopersici A* se agrupa con los dos genotipos de *radicis-lycopersici*, lo que sugiere que existen similitudes genéticas entre estas dos formas especiales, tal como lo han reportado Van Putten *et al.* (2003).

Los análisis con marcadores moleculares permiten identificar diferencias a nivel de ADN y en este estudio las tres técnicas lo evidenciaron sobre las cuatro formas especiales utilizadas. RAPD detectó polimorfismos entre los genotipos: *cofeae*, *ciceris*, *radicis-lycopersici* y *lycopersici*, e incluso variación entre los genotipos *lycopersici*; esta técnica ha sido ampliamente usada para estimación de la diversidad genética de especies y razas de *Fusarium* (Chandra *et al.*, 2008). Por otra parte Paavanen *et al.* (1999) detectaron alta variabilidad genética en aislamientos de

F. oxysporum con RAPD, además de que la resolución fue mejor comparada con isoenzimas; por otro lado, Manulis *et al.* (1994) indicaron que RAPD es un procedimiento simple, rápido y reproducible comparado con otras técnicas. MP-PCR también detectó polimorfismos entre las cuatro formas especiales, sin embargo, éstos no fueron lo suficientemente claros en este estudio debido a que hay presencia de barridos originados por una gran cantidad de fragmentos amplificados por la secuencia de los iniciadores utilizados, característica propia de la técnica que indica la gran cantidad de amplicones; pero que debido a su cercanía en pesos moleculares, no se aprecian en esta clase de geles. Barve *et al.* (2001) identificaron diferencias con este tipo de marcadores en cuatro razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y Bogale *et al.* (2005) mostraron que los polimorfismos detectados son suficientes para el estudio de la diversidad genética en aislamientos de *F. oxysporum*.

La técnica RAMPnr detectó alta variabilidad genética a través de perfiles abundantes y mayor número de polimorfismos claramente nítidos. Según Barve *et al.* (2001) señalan que los marcadores basados en microsatélites son los mejores para el estudio de *F. oxysporum*, debido a que son marcadores versátiles particularmente útiles para el análisis de poblaciones. Por otro lado, Hancock y Simon (2005) mencionan que este tipo de marcadores son capaces de diferenciar especies altamente relacionadas y de acuerdo a Esselman *et al.* (1999) también detectan mayor cantidad de polimorfismos, por lo que se han utilizado ampliamente para el análisis de poblaciones de hongos (Chan-



dra *et al.* 2008). El análisis filogenético hace posible la identificación de formas especiales y razas de patógenos, este tipo de comparaciones es necesario para la identificación de estos organismos, en donde las medidas de control pueden resultar poco efectivas si no se identifica correctamente al organismo causal, sobre todo cuando no existe diferencia a nivel morfológico. Las tres técnicas utilizadas fueron capaces de diferenciar de manera rápida e inequívoca a cada forma especial de *Fusarium oxysporum*, además de proporcionar datos con los cuales es posible diferenciar organismos de una misma especie tan compleja como es el caso de *F. oxysporum*.

LITERATURA CITADA

- Arbelaéz, T.G., 2000. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana* 17: 11-22.
- Baayen, R.P., K. O'Donnell, P.J.M. Bonants, E. Cigelnik, L.P.N.M. Kroon, E.J.A. Roebroek, C. Waalwijk, 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* 90: 891-900.
- Barve, M.P., M.P. Haware, M.N. Sainani, P.K. Ranjekar, V.S. Gupta, 2001. Genetic diversity in Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, chickpea wilt pathogen. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 138-147.
- Baysal, Ö., Ç. Karaaslan, M. Siragusa, R. Alessandro, F. Carimi, F. De Pasquale, J.A. Teixeira da Silva, 2013. Molecular markers reflect differentiation of *Fusarium oxysporum* formae speciales on tomato and forma on eggplant. *Biochemical Systematics and Ecology* 47: 139-147.
- Baysal, Ö., M. Siragusa, H. Ikten, I. Polat, E. Gümrcükü, F. Yigit, F. Carimi, J.A. Teixeira da Silva, 2009. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and their genetic discrimination by molecular markers in West Mediterranean region of Turkey. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 68-75.
- Bentley, S., K.G. Pegg, N.Y. Moore, R.D. Davis, I.W. Buddenhagen, 1998. Genetic variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analyzed by DNA fingerprinting. *Phytopathology* 88: 1283-1293.
- Bogale, M.B., D. Wingfield, M.J. Wingfield, E.J. Steenkamp, 2005. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates from Ethiopia using AFLP, SSR and DNA sequence analyses. *Fungal Diversity* 23: 51-66.
- Chandra, N.S., S.A.C. Udaya, S.R. Niranjana, H.S. Prakash, 2008. Molecular detection and characterisation of *Fusarium verticillioides* in maize (*Zea mays* L.) grown in southern India. *Annals of Microbiology* 58: 359-367.
- Esselman, E.J., L. Jianqiang, D.J. Crawford, J.L. Windus, A.D. Wolfe, 1999. Protocols for the inter simple sequence approach. *Molecular Ecology* 8: 443-451.
- Geiser, D.M., G.M.M. Jiménez, S. Kang, I. Makalowska, N. Veeraghavan, T.J. Ward, N. Zhang, G.A. Kuldau, K. O'Donnell, 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473-479.
- Hancock, J.M., M. Simon, 2005. Simple sequence repeats in proteins and their significance for network evolution. *Gene* 345: 113-118.
- Kelly, A.G., B.W. Bainbridge, J.B. Heale, A.E. Pérez, D.R.M. Jiménez, 1998. In plant-polymerase chain reaction detections of the wilt inducing pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 397-409.
- Kelly, A., J.A.R. Alcalá, B.W. Bainbridge, J.B. Heale, A.E. Pérez, D.R.M. Jiménez, 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology* 84: 1293-1298.
- Kistler, H.C., 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87: 474-479.
- Kistler, H.C., P.W. Bosland, U. Benny, S. Leong, P.H. Williams, 1987. Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifer measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology* 77: 1289-1293.
- Kristensen, R., M. Torp, B. Kosiak, J.A. Holst, 2005. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological Research* 109: 173-186.
- Kuninaga, S., R. Yokosawa, 1989. Genetic relatedness within and between formae speciales of *Fusarium oxysporum* measured by DNA-DNA reassociation kinetics. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55: 216-223.
- Luna, P.A., R.H.V. Silva, M.N. Marbán, M.E. Valadez, 2004. Variabilidad genética de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:FR. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K. Sato mediante PCR-RAPD's en el Bajío México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 44-51.
- Manulis, S., R.M. Kogan, Y. Benyephet, 1994. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. *Journal of Phytopathology* 84: 98-101.
- O'Donnell, K., H.C. Kistler, P.R.C. Cigelnik, 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 2044-2049.
- Paavanen, H.S., N.J. Hyvo, S.A. Bulat, M.T. Yli, 1999. RAPD-PCR, isozyme, rDNA RFLP and rDNA sequence analyses in identification of Finnish *Fusarium oxysporum* isolates. *Mycological Research* 103: 625-634.
- Seifert K.A., 2001. *Fusarium* and anamorph generic concepts. In: Summerell B.A., J.F. Leslie, D. Backhouse, W.L. Bryden, L.W. Burgess (eds.), *Fusarium*. APS Press. St. Paul, Minnesota. pp. 15-28.
- Vakalounakis, D.J., G.A. Fragkiadakis, 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from Cucumber: Differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD fingerprinting. *Phytopathology* 89: 161-168.
- Valadez, M.E., G. Kahl, I.A. Rubluo, R. Arreguín-Espinoza de los Monteros, 2005. Optimización de las huellas de DNA obtenidas con RAPDs y MP-PCR mediante la técnica RAMPnr. *Revista Chapingo Serie Horticultura* XI: 351-356.
- Van Putten, W.F., A. Biere, J.M.M. Van Damme, 2003. Intraspecific competition and mating between fungal strains of the anther smut *Microbotryum violaceum* from the host plants *Silene latifolia* and *S. dioica*. *Evolution* 57: 766-776.
- Wulff, E.G., J.S. Sørensen, M. Lübeck, K.F. Nielsen, U. Thrane, J. Torp, 2010. *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. *Environmental Microbiology* 12: 649-657.