

## **Caracterización de especies de *Fusarium* mediante patrones electroforéticos de proteínas\***

**Nelly Sanabria de A.\*\*; Angel Guadarrama\*\*  
Hilda Romero\*\*\***

### **ABSTRACT**

The objective of this research was the morphological and electrophoretical characterization of three fungous isolates of *Fusarium* genus (*Fusarium solani*, *F. moniliforme*, and *F. oxysporum*) in several hosts and localities of Venezuela. Antigens were obtained from culture filtrates and homogenized mycelium. The electrophoretic characteristics of total proteins were determined by electrophoresis through the polyacrymide gel discontinuous system (DISC-PAGE) for native proteins and SDS-DISC-PAGE for dissociated proteins. For protein extraction, mycelium was macerated ten times by freezing and melting with buffer (tris-HCL 0.5, pH 6.8), and centrifuged at 20000 g for 20 minutes. Run was with 100 V and 20 m Amp. Gels were colored with 1% solution of blue coomasie R-250. Low molecular weight patterns were used as control

---

Recibido: octubre, 2001

Aceptado: noviembre, 2002

\* Proyecto financiado por el CONICIT y el CDCH de la UCV

\*\* Instituto de Botánica, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Apdo. 4579, Maracay, 2101. Aragua, Venezuela

\*\*\* Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina de la UCV.

(29-205Kda; Sigma) for dissociated proteins. Protein concentrations were determined by the Bradford method. Protein electrophoretic profiles of *Fusarium* species showed differences in both, the number of bands and the molecular weight.

**Key words:** Electrophoresis, *Fusarium*, proteins

## COMPENDIO

Esta investigación, tuvo como objetivo la caracterización morfológica y electroforética de tres aislamientos fúngicos del género *Fusarium* (*F. solani*, *F. moniliforme* y *F. oxysporum*). Se obtuvieron antígenos de los tres aislamientos, a partir de filtrados de cultivo y micelio homogeneizado. Para la caracterización electroforética de las proteínas totales de las especies en estudio, se utilizó la electroforesis mediante el sistema discontinuo de geles de poliacrilamida; para proteínas nativas (Disc-PAGE) y para proteínas disociadas (SDS-Disc-PAGE). Para la extracción de proteínas el micelio fue macerado diez veces por congelación y descongelación con buffer (tris-HCl 0.5 M, pH 6.8) y centrifugado a 20000 g por 20 minutos. La corrida se realizó con 100 V y 20 m Amp. Los geles fueron teñidos con una solución al 1% de azul de Coomassie R-250 como control. Se usaron patrones de bajo peso molecular (29 a 205 kDa; SIGMA), para las proteínas disociadas. Las concentraciones protéicas se calcularon por la técnica de Bradford. Los perfiles electroforéticos de las proteínas totales de las tres especies, presentaron diferencias en cuanto al número de bandas y a los pesos moleculares de sus proteínas.

**Palabras clave:** electroforesis, *Fusarium*, proteínas

## INTRODUCCION

El género *Fusarium* comprende un amplio y heterogéneo grupo de hongos de distribución mundial, frecuentemente aislados como saprófitos en aguas, suelos y substratos orgánicos en descomposición (Luque *et al.*, 1995). Muchos son de importancia considerable en la industria como contaminantes de alimentos, ya que durante su ciclo de vida producen micotoxinas.

Como patógenos de humanos se les responsabiliza de causar queratomycosis o úlceras de la cornea, infecciones cutáneas, meningoencefalitis, onicomycosis, tumores malignos, peritonitis y micosis superficiales (Thomas y Geraldine, 1992; Luque *et al.*, 1995; Gari-Toussaint *et al.*, 1997; Pereiro *et al.*, 1997).

Como fitopatógenos, las especies de este género infectan un gran número de plantas cultivadas. La presencia de especies fitopatógenas de *Fusarium* en el suelo es uno de los principales impedimentos para la siembra continua de los campos. Es importante señalar la existencia de especies saprófitas. También se señala al género *Fusarium* como patógeno de insectos e hiperparásitos de algunas especies fitopatógenas del género y de otros hongos fitopatógenos (Kitagawa *et al.*, 1989).

Antes del advenimiento de las técnicas bioquímicas, la taxonomía y la clasificación de los hongos del género *Fusarium* estuvo basada principalmente en criterios morfológicos y en características primarias y secundarias. Las primarias son: formas de macroconidias, de microconidias, si son llevadas en cadenas o no y el tipo de microconidióforo. Las secundarias incluyen presencia de clamidosporas, su configuración y posición, y la presencia o ausencia de esporodoquios. Sin embargo, las especies se destacan por su variabilidad especialmente en cultivos artificiales, al punto que en determinadas condiciones, diferentes especies son morfológicamente idénticas (Joffe, 1974). Las características de la colonia como: morfología, pigmentación y diámetro pueden ser consideradas si se usa un procedimiento estándar (Windels, 1991). En estos procedimientos deben considerarse los casos de las mutaciones que ocurren en cultivos artificiales que llevan a diferencias significativas con respecto a la morfología y fisiología (Nelson *et al.*, 1983).

La situación tiende a complicarse cuando se requiere diferenciar formas especiales de una especie o razas fisiológicas de una forma especial; en este caso se hace necesario el uso de las pruebas de patogenicidad (Iannelli *et al.*, 1982).

Todo esto ha hecho difícil la delimitación de especies, formas especiales y razas de *Fusarium* lo que ha llevado a los micólogos a buscar alternativas para facilitar los trabajos taxónomicos.

Investigadores han demostrado que las técnicas de separación de proteínas fúngicas por electroforesis, son un gran apoyo a los criterios morfológicos tradicionales para la delimitación dentro y entre especies. Esta técnica ha sido usada en la identificación de aislamientos a nivel de especies (Gallegly, 1983; Kitagawa *et al.*, 1989; Szecsi, 1990; Partridge, 1991; Magnano *et al.*, 1995).

En esta investigación se utilizó la técnica electroforética de patrones de proteínas en tres especies fitopatógenas de *Fusarium*, de tal manera que se puedan utilizar posteriormente con fines de diagnóstico y en estudios epidemiológicos en el laboratorio de enfermedades de plantas del Instituto de Botánica de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (UCV). La caracterización bioquímica de estos hongos constituye el inicio del estudio comparativo de diferentes especies, aspecto necesario para la diferenciación taxonómica de este género.

## MATERIALES Y METODOS

**1. Obtención y cultivo de especies de *Fusarium*.** Para esta investigación se realizaron aislamientos de *Fusarium* de raíces de cítricos con pudriciones, semillas manchadas de maíz y plantas de tomate con marchitez provenientes de Montalban (Carabobo), San Javier (Yaracuy) y de Tocarón, estado Aragua, respectivamente. Estas muestras fueron ingresadas a la clínica Fitopatológica de la Facultad de Agronomía de la UCV para ser procesadas.

Todos los aislamientos fueron realizados a partir de secciones de las muestras previamente desinfectadas mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 1% por dos minutos, seguidamente se colocaron en placas de Petri con papa dextrosa agar (PDA), las cuales se colocaron en incubación en una estufa a 28°C por cinco días y posteriormente fueron transferidas a tubos con PDA inclinado donde se dejaron crecer por ocho días y luego se guardaron en refrigeración, hasta el momento de su utilización

**2. Descripción y caracterización de las especies de *Fusarium* en base a criterios morfológicos.** Para realizar las descripciones se tomaron en cuenta tanto las observaciones macroscópicas como las microscópicas; las cuales se realizaron de las colonias crecidas en PDA y en agar hojas de clavel (AHC). Para las descripciones macroscópicas se consideraron las características como crecimiento a los ocho días, color y aspecto de la colonia, así como la presencia de esporodoquios.

Para la descripción microscópica se consideraron las características de los conidióforos, microconidias (forma, presencia de septas y dimensiones), de las macroconidias (forma, número de septas y dimensiones) y de las clamidosporas la forma, posición (intercalares o terminales), la superficie y el diámetro. Los aislamientos fueron enviados al *Fusarium* Research Center de la Universidad de Pensilvania en USA, con el fin de corroborar la identificación de las especies.

**Electroforesis en gel poliacrilamida (PAGE y PAGE-SDS).** Para determinar las relaciones electroforéticas de proteínas solubles totales entre las diferentes especies de *Fusarium* se utilizaron las técnicas de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y del sistema discontinuo de electroforesis en geles de poliacrilamida (DISC PAGE) (Clare, 1963; Clare y Zentmeyer, 1966; Laemmli, 1970), las cuales se realizaron mediante las siguientes etapas:

- a. Cultivo del hongo.** Los aislamientos de *Fusarium* fueron sembrados en frascos que contenían 50 ml de Sabouraud e incubados a temperatura ambiente en agitación mecánica constante por cuatro días. Luego se añadió Tiomersal (1:10000). El micelio del cultivo se separó por filtración usando papel de filtro Whatman N° 2, se lavó con agua destilada estéril fría tres veces para eliminar residuos del medio y finalmente fue congelado a -20°C
- b. Extracción y determinación de proteínas totales.** Para obtener el extracto proteico, el micelio congelado fue macerado en mortero diez veces, seguido de continuos congelamientos. El macerado se realizó sobre hielo y se le agregó el buffer de extracción tris-HCl 0.5M pH 6.8 en relación 4:1 (p/v) y homogeneizándolo manualmente, luego se llevó a congelación por 24 horas. Seguidamente la suspensión ya homogeneizada se centrifugó a 20000g, 4°C por 20 minutos. El sobrenadante que constituye el extracto proteico se recuperó y se conservó en congelación a 20°C hasta el momento de usarla en la determinación de proteínas y para las corridas

electroforéticas. Para determinar el contenido de proteína se siguió el método de Bradford (1976) utilizando una curva patrón de albúmina bovina

- c. Preparación de la muestra.** Las muestras para la electroforesis fueron preparadas con extractos de proteínas nativas o sin desnaturalizar (DISC-PAGE) para los geles de poliacrilamida, fueron mezclados 200 ml del extracto proteico con 50 ml de glicerol y 5 ml de azul de bromofenol al 1%.

En el caso de DISC-PAGE-SDS o proteínas desnaturalizadas, se mezclaron 120 ml del extracto proteico, 30 ml de mercaptoetanol-SDS se calentaron por cinco minutos en baño de María a 95°C. Finalmente se agregaron 50 ml de glicerol al 85% y 5 ml de azul de bromofenol. Junto con las muestras para PAGE-SDS, se preparó un patrón de proteína estándar de Sigma, compuesto por mezclas de proteínas de diferentes pesos moleculares (Miosina, 205 kDa;  $\beta$ -Galactosidasa, 116 kDa; fosforilasa, 97 kDa; albúmina de suero bovino, 66 kDa; albúmina de huevo, 45 kDa y anhidrasa carbónica, 29 kDa)

- d. Preparación de los geles.** Para la preparación de los geles se siguió la metodología de Laemmli (1970) con algunas modificaciones. Se usó el sistema discontinuo de poliacrilamida usando un gel concentrador al 4% y separador al 10% en cámara BIO-RAD (minigeles de 8x10 cm). La solución monomérica al 30% se preparó con 9 g de acrilamida y 0.24 g de Bis-acrilamida en 30 ml de agua destilada. Para obtener dos geles del sistema discontinuo tanto para PAGE como para PAGE-SDS, se preparó un volumen de 10 ml, para lo cual se procedió a mezclar las soluciones de la manera descrita por Sanabria (1998).

Para obtener los geles, los reactivos fueron agregados por separado, para el gel separador y el gel concentrador, pero en forma simultánea. Cuando sólo faltaba el persulfato de amonio (PA), se le agregó, primero al separador y se vació inmediatamente, luego PA al gel concentrador y se vació sobre el separador. Enseguida se colocaron los peines, hasta lograr la solidificación, se procedió a retirar los peines y los geles se colocaron en el tanque de la cámara BIO-RAD, se agregó el buffer de corrida tris-glicina pH 8.8, se le agregaron 10 ml de la muestra en cada carril y se terminó de colocar el buffer de corrida, llenando completamente la cubeta de la cámara

- e. Corrida electroforética.** Una vez dispuestos los geles en la cámara electroforética se colocaron a 4°C, se conectaron los electrodos a la fuente de poder y se llevó a 100V. La corrida se realizó en un período de dos horas. Una vez que la línea de azul de bromofenol alcanzó cerca de 0.5 cm de la extremidad inferior del gel, se desconectó la fuente de poder. Todas las corridas electroforéticas se realizaron por cuadruplicado
- f. Tinción.** Los geles se colocaron en bandejas y fueron teñidos por 24 horas en agitación con 50 ml de solución fijadora (60 g ácido tricloroacético, 200 ml de metanol, 70 ml de ácido acético glacial al 90% y 800 ml de agua) y 1.25 ml de azul de Coomasie al 1%. Se lavaron los geles por una hora en una solución decolorante. Para la evaluación se observaron los patrones electroforéticos de las proteínas de cada especie de *Fusarium*, se determinó el número y posición de las bandas y en PAGE-SDS se relacionó la posición de éstas con los patrones de proteínas estándares.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Descripción e identificación de las especies de *Fusarium*

***Fusarium solani*.** Se caracterizó por presentar una colonia de color crema a durazno, con leves tintes púrpura, de crecimiento rápido, de 9 cm a los ocho días. Las microconidias se formaron abundantemente sobre microconidióforos largos, en falsa cabezuelas, hialinas, cilíndricas o alantoides de una a dos células, de 9-16 x 3-5 mm. Las macroconidias se formaron sobre conidióforos bien desarrollados, ramificados o no ramificados, monofálides, cilíndricas a falcadas, con células basal y apical diferentes del resto de la conidia, de 38-65 x 5-8 mm. Las clamidosporas de redondeadas a ovaladas, de paredes lisas a levemente rugosas, generalmente en pares terminales o intercaladas y de 8-10.4 mm de diámetro.

***Fusarium moniliforme*.** Las colonias fueron de crecimiento moderadamente rápido, de 8 cm a los ocho días, de color blanco a durazno. Microconidias abundantes, generalmente de una célula, de oval a ovoide, en largas cadenas o en falsas cabezas, de 5-10 x 3-4 mm. Conidióforos largos, no ramificados y ramificados, monofálides y polifálides. Macroconidias presentes pero escasas, variando de forma levemente curva a casi rectas, de paredes delgadas, de 13-34 x 3-5 mm. Clamidosporas ausentes.

***Fusarium oxysporum***. Las colonias presentaron aspecto felpudo en el centro y difuso en la periferia, de crecimiento lento, 6 cm a los ocho días, inicialmente de color blanco y luego se tomaron púrpura. Microconidias hialinas, de oval a alantoide, una a dos células, en falsas cabezas, monofialides, 8-13 x 3-4 mm. Conidióforos cortos, simples o ramificados. Macroconidias en esporodocios, generalmente de tres a cinco septas, de 12-31 x 3-4 mm. Clamidosporas terminales o intercalares, generalmente redondeadas, de 8-10 mm de diámetro.

Las características de las colonias, así como el tamaño y forma de las estructuras microscópicas tales como microconidias, macroconidias y clamidosporas, se corresponden con las descritas para *F. solani*, *F. moniliforme* y *F. oxysporum*, por Booth (1971) y Nelson *et al.*, (1983). Esta identificación fue corroborada por el P. Nelson, del *Fusarium* Research Center de la Universidad de Pensilvania en USA.

### Patrones electroforéticos de proteínas

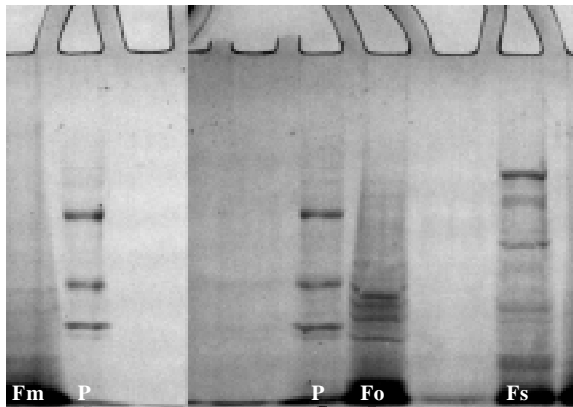
Mediante la técnica de electroforesis, se establecieron diferencias y semejanzas entre las especies de *Fusarium* en estudio.

El protocolo utilizado para la extracción de proteínas totales, resultó un método apropiado ya que permitió obtener, los perfiles electroforéticos de proteínas (PEP), tanto de proteínas nativas (DISC-PAGE), como las proteínas desnaturalizadas (SDS-DISC-PAGE) respectivamente. En éstos se puede observar el número de bandas y la posición de éstas. En el caso de las proteínas nativas se observa para *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. moniliforme* nueve, once y ocho bandas respectivamente. Comparando el PEP de cada especie la posición de las bandas, se encontró cierta similitud en la posición de algunas bandas del PEP de *F. oxysporum* y el de *F. moniliforme*. Esta mayor similitud entre las bandas de proteínas de estas dos especies puede representar una relación filogenética más estrecha.

En el caso de los PEP obtenidos mediante SDS-DISC-PAGE (Figura 1) se pudo observar cierta similitud en cuanto a la posición de las bandas en los perfiles electroforéticos de las especies de *Fusarium*, en comparación con el patrón estándar de proteínas. Los PEP de *F. oxysporum* y *F. moniliforme* que presentan 18 y 21 bandas respectivamente, se encuentran dispuestos entre las proteínas con peso moleculares menores de 34 y 40 kDa, respectivamente, a

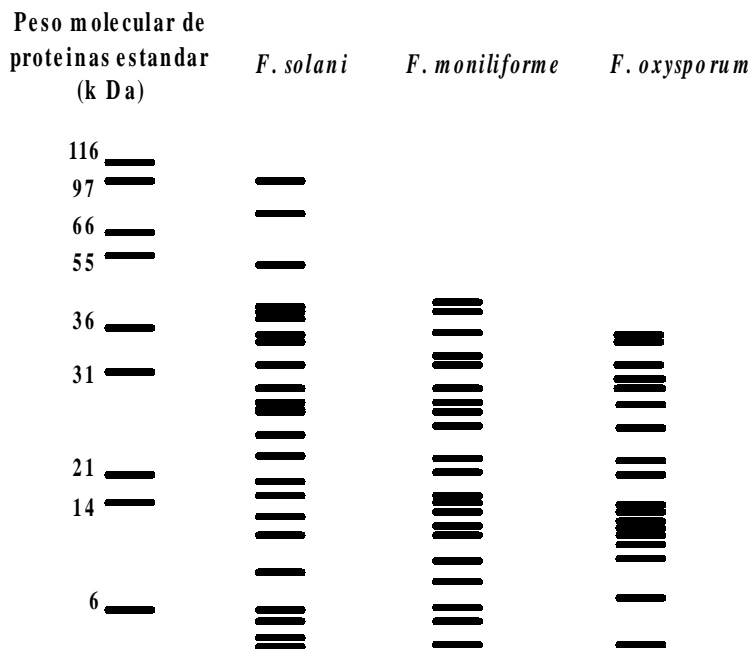
diferencia de *F. solani* cuyas bandas además de más numerosas (23 bandas) tienen posiciones diferentes, de las cuales, dos están dispuestas entre proteínas 97 y 55 kDa, 18 bandas entre 6 y 55 kDa y tres bandas por debajo de la proteína de 6 kDa.

En el esquema de la Figura 2, se muestran los valores de movilidad relativa (Mr) de las seis bandas de proteínas que coinciden en las tres especies, los cuales fueron 0.54, 0.58, 0.63, 0.75, 0.79, y 0.80, comprendidas entre 34 y 10 kDa. En este esquema se observa además, que los patrones de proteínas de *F. moniliforme* y *F. oxysporum* tienen mayor similitud, ya que además de las seis bandas antes señaladas que coinciden con las tres especies, hay otras cuatro (Mr: 0.72, 0.76, 0.83, 0.86) que coinciden teniendo así en total diez bandas comunes entre estas dos especies. Esta mayor similitud entre las bandas de proteína de estas dos especies puede estar relacionada con una relación filogenética más estrecha entre *F. oxysporum* y *F. moniliforme*; en cambio *F. solani* estaría más distante.



**Figura 1.** Patrones electroforéticos de proteínas de *Fusarium moniliforme* (Fm), proteína estándar (P), *Fusarium oxysporum* (Fo) y *Fusarium solani* (Fs)

Los resultados permiten deducir la utilidad de esta técnica para diferenciar especies, coincidiendo parcialmente con lo encontrado por Cachon en 1992, quien comparando los patrones electroforéticos de proteínas totales de *F. moniliforme* y *F. oxysporum*, observó que este último presentó mayor número de bandas que *F. moniliforme* y que estas dos especies presentaron cuatro bandas comunes.



**Figura 2.** Diagrama de los patrones electroforéticos de proteínas de las especies *Fusarium*.

En base a la posición, el número de bandas y casi un 50% de bandas coincidentes, se encontró una gran similitud entre los PEP de *F. oxysporum* y *F. moniliforme*, con lo cual se corrobora cierta relación entre estas dos especies, manifestada a través de las pruebas serológicas de doble difusión (Sanabria, 1998). Las diferencias encontradas en cuanto a los PEP de las tres especies de *Fusarium* en estudio, coinciden con los resultados obtenidos por Partridge (1991) quien trabajando con varias especies de *Fusarium* encontró que había una considerable diversidad de las proteínas ribosomales entre especies, señalando que éstas proveían de una adecuada herramienta fenotípica para ayudar a la identificación de especies. Señalando además que la proteína ribosomal estructural de ciertas especies de *Fusarium* eran diferentes y en muchos casos eran únicas para cada especie, encontrando mayor similitud entre las especies que tenían una forma teleomórfica común.

Actualmente, los PEP tiene una gran potencialidad ya que, como lo han señalado varios investigadores trabajando con especies de diferentes hongos, demostraron que cada especie posee un patrón de proteínas totales característico. (Clare, 1963; Gill y Zentmeyer, 1978; Petrini *et al.*, 1990; Cachon, 1992; Magnano *et al.*, 1995). Sin embargo, Magnano y col. 1995, señala que los PEP no permiten la diferenciación de categorías infraespecíficas. En estos casos lo recomendable es el uso de otras técnicas como el análisis isoenzimático o técnicas moleculares más sofisticadas como PCR, RFLP o RAPD. En Venezuela, poco se ha investigado en el género *Fusarium*, sin embargo, con este tipo de estudio, que forma parte de la caracterización bioquímica de este grupo de hongos, constituye el inicio del estudio comparativo de diferentes aislamientos, aspecto necesario para la diferenciación taxonómica de este género. De esta forma se establecen las bases para realizar investigaciones que apoyan los procedimientos tradicionales de investigación de este género y de otros hongos fitopatógenos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Kew Surrey England. Commonwealth Mycological Institute. 237 p.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72:248-254.
- Cachon, A. 1992. Comparación de patrones electroforéticos de dos especies de *Fusarium*. *En: Resúmenes de Avances en Biotecnología Moderna*. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba. I:1420.
- Clare, B. 1963. Starch - gel electrophoretic of proteins as an aid and identifying fungi. *Nature* 200:803-804.
- Clare, B.; G. Zentmeyer. 1966. Starch - gel electrophore is of proteins species of *Phytophthora*. *Phytopathology* 56:1334-1335.
- Gallegly, M. 1983. New criteria for classifying *Phytophthora* and critique of existing approaches. *En: Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*. Erwin D. C., S. Bartnicki-García and P. H. Tsao. (Eds.). St. Paul, Minnesota. The American Phytopathological Society. 392 p.

- Gari-Toussaint, M.; J.M. Leguay; C. Zur; J. F. Michiels; L. Ferrara; F. Negre; L. Fichoux. 1997. Keratite a *Fusarium solani* chez une patiente diabétique. J. Mycol. Med. 7:227-231
- Gill, H.; G. Zentmeyer. 1978. Identification of *Phytophthora* species by disc electrophoresis. Phytopathology 68:163-167.
- Iannelli, R.; F. Capparelli; G. Cristinzio; F. Marziano; F. Scala; C. Noviello. 1982. Serological differentiation among formae speciales and Physiological races of *Fusarium oxysporum*. Micologia 74:313-319.
- Joffe, A. Z. 1974. A modern system of *Fusarium* taxonomy. Mycopathologia et Mycologia Applicata 53: 201-228.
- Kitagawa, T.; Y. Sakamoto; H. Ogura. 1989. A novel enzyme Cryptogea isolates from chilean kiwifruit and immunoassay for conidia of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* F504. Microbiology and Immunology 33(9):775-785.
- Kitagawa, T.; Y. Sakamoto; K. Furumi; H. Ogura. 1989. Novel enzyme immunoassays for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and for general detection of various *Fusarium* species. Phytopathology 79(2):162-165
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Luque, A.; M. Biasoli; D. Alvarez. 1995. Aumento de la incidencia de micosis superficiales producidas por hongos del género *Fusarium*. Revista Iberoamericana de Micologia 12:65-67.
- Magnano, G.; F. Scala; Q. Micheli. 1995. Moderne technique diagnostiche in micologia fitopatologica. Petria 5:53-90
- Nelson, P.; T. Toussoun; W. Marasas. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. University Park, Pennsylvania State University Press. 193 p.
- Partridge, J. 1991. Specific gene products of *Fusarium*: Analisis of Ribosomal Proteins. Phytopathology 81:1055-1058.
- Pereiro, M.; E. Pereiro; J. Toribio, M. Pereiro-Miguens. 1997. Superficial white toenail onychomycosis due to *Fusarium oxysporum*. J. Mycol. Med. 7:219-222.

- 
- Petrini, O.; L. Toti; L. Petrini; V. Heiniger. 1990. *Gremmeniella abietina* and *Gremmeniella laricina* in Europa: Characterization and identification of isolates and laboratory strains by soluble protein electrophoresis. *Canadian Journal of Botany* 68:2629-2635.
- Sanabria, N. 1998. Serología y electroforesis para la identificación de especies de *Fusarium*. Tesis Doctorado en Ciencias Agrícolas, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Instituto de Botánica, Maracay. 110 p.
- Szecs, A. 1990. Analysis of Pectic Enzyme Zymograms of *Fusarium* species. I. *Fusarium lateritium* and related species. *Journal Phytopathology* 128:75-83.
- Thomas, P.A.; P. Geraldine. 1992. Fungal keratitis due to *Fusarium* and other fungi. *J. Mycol. Med.* 2:121-131.
- Windels, C. 1991. Current status of *Fusarium* taxonomy. *Phytopathology* 8:1048-1050.