

Diferenciación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. o.* f. sp. *radicis-lycopersici* y su detección en planta mediante marcadores RAPD

C. CARBONELL, D. CIFUENTES, J. TELLO y J. L. CENIS

En este trabajo se estudia la aplicación de los marcadores RAPD para la diferenciación rápida de las formas especiales *lycopersici* (Fol) y *radicis-lycopersici* (Forl) de *Fusarium oxysporum*. Se estudiaron 32 cepas de Fol y 15 de Forl, aisladas de la zona de cultivo de tomate de Aguilas y Mazarrón (Murcia) y Almería. Las cepas de Fol mostraron una gran uniformidad genética, agrupándose en dos haplotipos, frente a los 10 haplotipos detectados en Forl. De los 10 cebadores que permitieron las amplificaciones más completas, todos produjeron polimorfismos que permitieron distinguir de forma inequívoca las dos formas especiales.

Los RAPDs se utilizaron también para detectar la presencia *F. o. lycopersici* en plantas de tomate infectadas. Amplificando el ADN extraído de una planta enferma y comparando el patrón de bandas obtenido con el producido por la planta sana y el hongo aislado, se pudo identificar en las plantas enfermas una banda de ADN correspondiente al hongo.

C. CARBONELL y J. L. CENIS. CIDA, 30150 La Alberca (Murcia)
D. CIFUENTES. EUITA, Universidad de Murcia, Cartagena
J. TELLO. INSPV, Ctra. La Coruña, km. 7,5. 28040 Madrid

Palabras clave: ADN Polimórfico amplificado al azar, Reacción en cadena de la polimerasa, PCR, Fusariosis, Tomate.

INTRODUCCION

El hongo *Fusarium oxysporum*, en sus formas especializadas *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hans. y *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker es uno de los patógenos más importantes del cultivo del tomate. *F. o. lycopersici* (Fol) está ampliamente distribuido en todo el mundo y su importancia como causante de traqueomycosis es conocida en todas las zonas de cultivo de tomate. *F. o. radicis-lycopersici* (Forl) produce una enfermedad diferente, conocida como «podredumbre del cuello y las raíces del tomate». Es una forma especial descrita por primera vez en 1978 (JARVIS y SHOEMAKER, 1978), pero ya extendida por las zonas de cultivo

más importantes del mundo. En España ha sido citada por primera vez por TELLO y LA-CASA (1988).

Ambos patógenos son morfológicamente indistinguibles, a pesar de que producen enfermedades diferentes, con síndromes que revelan distintas habilidades parasitarias. Esto dificulta su identificación en suelo y complica cualquier estudio epidemiológico, repercutiendo negativamente en un control más ajustado y rápido. Hasta ahora, la única manera para distinguir aislados de ambas formas especializadas, consiste en inocularlos sobre plantas de tomate susceptibles y examinar los síntomas producidos. Ello implica un costo considerable en instalaciones y tiempo de espera.

Un enfoque diferente para distinguir las dos formas especiales con mayor rapidez sería la utilización de técnicas genéticas con el fin de detectar polimorfismos específicos de algunas de las dos formas. Del amplio grupo de técnicas disponibles la más prometedora en principio es la RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA-PCR) (WILLIAMS *et al.*, 1990). Esta técnica es una variante de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (SAIKI *et al.*, 1985) que mediante la utilización de cebadores de secuencia arbitraria y reducida temperatura de anillamiento permite la amplificación de fragmentos de ADN altamente polimórficos distribuidos al azar por todo el genoma. La RAPD-PCR destaca por su gran poder resolutivo con un coste relativamente bajo. Así, en un estudio de 38 cepas españolas de *Rhizoctonia* spp., CENIS *et al.*, (1992) encuentran una pauta de bandas amplificadas diferente para cada una de las cepas.

A pesar de la relativa juventud de la técnica, ésta ha sido ampliamente utilizada en el estudio de hongos. Centrándonos en el género *Fusarium*, se pueden citar los trabajos de CROWHURST *et al.*, (1991), en el que distinguen las razas 1 y 2 de *F. solani* f. sp. *cucurbitae*, GRAJAL-MARTIN *et al.*, (1993), que distinguen la raza 2 de *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, y OUELLET y SEIFERT (1993), que separan diferentes cepas de *F. graminearum* basándose en los patrones de bandas RAPD.

Otra posibilidad, poco explorada, que ofrece la técnica RAPD, es la de detectar directamente la presencia del agente patógeno en una planta enferma. Aunque la ejecución de la técnica en una planta infectada conlleva la amplificación conjunta e indistinguible de ADN de la planta y el patógeno, la comparación de los patrones de bandas obtenidos mediante la amplificación por separado del hongo aislado, una planta sana y una infectada, permitiría identificar por comparación la presencia de las bandas pertenecientes al hongo en el patrón de la planta infectada.

El primer objetivo del presente trabajo es el de determinar si los marcadores RAPD son utilizables para distinguir de forma rápi-

da las formas especializadas *F. o lycopersici* y *F. o. radialis-lycopersici*. Un segundo objetivo es el de comprobar si puede detectarse la presencia del hongo en plantas de tomate infectadas mediante la comparación de las bandas de ADN amplificado obtenidas en la planta enferma con las obtenidas en la planta sana.

MATERIAL Y METODOS

Cepas utilizadas: Las cepas utilizadas procedieron de la colección de uno de los autores (J. Tello), mantenida en el INSPV. Todas ellas fueron aisladas de la zona del Sudeste Peninsular de España. La identificación de la forma especializada de la mayoría de ellas fue realizada en trabajos anteriores (TELLO y LACASA, 1988, 1990). Se utilizaron un total de 32 cepas de Fol y 15 de Forl cuyo código y procedencia aparece en el Cuadro 1.

Extracción de ADN y reacciones PCR: La extracción del ADN de las cepas se realizó mediante un método a pequeña escala descrito anteriormente (CENIS, 1992). Las reacciones PCR y la visualización de los resultados se realizaron en la forma descrita anteriormente (CENIS, 1993). Los cebadores utilizados fueron oligonucleótidos de 10 bases y secuencia arbitraria suministrados por Operon Technologies (Alameda, CA, EE.UU.).

Diseño del experimento y cebadores utilizados: En un primer experimento, se estudiaron todas las cepas, sometiéndolas a reacciones con los cebadores OPA-01, OPA-09, OPB-01 y OPB-02 que produjeron un total de 25 bandas. A partir de estas bandas, se calculó la similaridad entre las mismas mediante el estimador F de Nei y Li (1979). ($F = 2n_{xy} / n_x + n_y$, donde n_{xy} es el número de bandas compartidas por las cepas x e y, siendo n_x y n_y el número total de bandas de las dos cepas). Los datos de similaridad fueron utilizados para establecer un dendrograma, según el método UPGMA del programa NTSYS (ROHLF, 1988). En un segundo experimento, un conjunto de cepas

Cuadro 1.-Código y procedencia de las cepas utilizadas

Código	Lugar aislamiento	Código	Lugar aislamiento
Fol 31	Aguilas	Forl 1	Mazarrón
Fol 32	Aguilas	Forl 3	Mazarrón
Fol 33	Aguilas	Forl 4	Alhama
Fol 34	Aguilas	Forl 6	
Fol 35	Aguilas	Forl 8	Aguilas
Fol 36	Aguilas	Forl 9	Mazarrón
		Forl 12	Mazarrón
		Forl 13	Mazarrón
Fol 39	Aguilas	Forl 17	Mazarrón
Fol 40	El Alamillo (Mazarrón)	Forl 19	
Fol 41	El Alamillo (Mazarrón)	Forl 20	
Fol 42	El Alamillo (Mazarrón)	Forl 22	Almería
		Forl 25	C. Gallego
Fol 44	El Alamillo (Mazarrón)	Forl 27	Isla Plana
Fol 45	El Alamillo (Mazarrón)	Forl 29	Ramonete (Aguilas)
Fol 47	El Alamillo (Mazarrón)		
Fol 48	El Alamillo (Mazarrón)		
Fol 49	El Alamillo (Mazarrón)		
Fol 50	El Alamillo (Mazarrón)		
Fol 51	El Alamillo (Mazarrón)		
Fol 52	El Alamillo (Mazarrón)		
Fol 53	El Alamillo (Mazarrón)		
Fol 54	El Alamillo (Mazarrón)		
Fol 55	Aguilas		
Fol 56	Aguilas		
Fol 57	Aguilas		
Fol 58	Aguilas		
Fol 59	La Cañada (Mazarrón)		
Fol 60	La Cañada (Mazarrón)		
Fol 61	Aguilas		
Fol 62	Aguilas		
Fol 63	Aguilas		
Fol 65	Aguilas		
Fol 67	Aguilas		
Fol 68	Aguilas		

representativas de cada grupo así obtenido, fue sometido a reacciones con los 40 cebadores de los conjuntos OPA y OPB.

Detección del hongo en la planta: Para la detección del hongo en plantas enfermas, se procedió primero a la inoculación controlada de las mismas. Para ello se cultivaron 12 plantas de tomate cv «Muchamiel» en bandejas de plástico con un sustrato compuesto por turba y perlita al 50 %. Las plan-

tas fueron cultivadas en cámara climática, a una temperatura de 24 °C. Cuando las plantas tuvieron 4 hojas verdaderas, se tomaron fragmentos de hoja de cada planta de los que se extrajo el ADN por el método descrito para los hongos. A continuación se regó el sustrato con una solución de micelio y esporas del hongo, tal como se describe en TELLO y LACASA (1990). La inoculación se realizó con la cepa Fol-245 de *F.o. lycoper-*

sici. Al cabo de 50 días, las plantas comenzaron a manifestar síntomas de la enfermedad. Se cortaron fragmentos de tallo y peciolo de 2 cm y con signos de necrosis en el xilema, que se lavaron y flamearon. Estos fragmentos se dividieron en dos. Una parte fue procesada para la extracción de ADN por el método descrito anteriormente, y la otra fue sembrada en una placa de Petri con medio Komada, selectivo para *Fusarium*. El ADN obtenido de la planta infectada, el obtenido de la mismas plantas antes de la inoculación, y el del hongo, fueron sometidos a una PCR con el cebador OPB-02, en la forma descrita.

RESULTADOS

Diferenciación de las formas especiales:

El agrupamiento de las cepas obtenido tras el análisis con los cebadores OPA-01, -09, OPB-01 y -02, aparece expresado en el dendrograma de la Figura 1. (Las cepas Fol-31, -32, -34, -35, -36, -41, -48, -50, -51, -53, -54, -55, -56, -59, -61, -65, y -67 no se han representado en el mismo por tener un patrón de bandas idéntico al de las cepas del grupo Fol 33). La observación del dendrograma indica que las cepas de Fol se encuadran en dos haplotipos, muy similares entre sí. Uno de ellos agrupa a 29 cepas y el otro a tres.

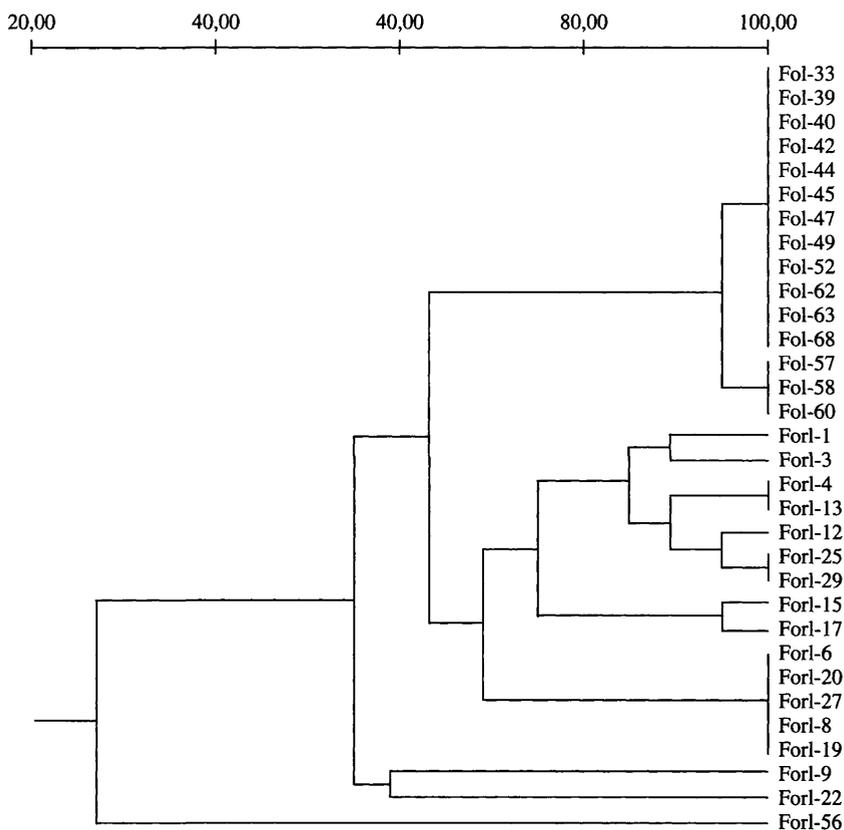


Fig. 1.—Dendrograma obtenido de los datos de similitud (porcentaje de bandas compartidas) de las cepas de Fol y Forl mediante el método UPGMA del programa NTSYS.

La cepa Fol-56, que aparece ampliamente divergente de todas las demás, resultó estar contaminada, como reveló un análisis posterior. Frente a esta gran uniformidad genética de las cepas de Fol, se constata una mayor diversidad en las cepas de Forl. Hasta 10 haplotipos se detectan en el conjunto de 15 cepas de Forl. Uno de ellos engloba a 5 cepas, mientras que otros siete están constituidos por una sola cepa.

A partir de los resultados expresados en el dendrograma, se seleccionó una cepa representativa de cada uno de los haplotipos. Las cepas escogidas fueron dos de Fol (Fol 39 y 57) y siete de Forl (Forl 1, 4, 9, 12, 15, 19 y 25). Este grupo de 9 cepas se sometió a un análisis más detallado con un mayor número de cebadores. De los 40 cebadores ensayados con estas cepas, la mayoría no dieron una amplificación satisfactoria de todas las cepas. Los más eficientes resultaron ser los OPA-01, OPA-09, OPB-01, OPB-02, OPB-

03, OPB-05, OPB-06, OPB-07, OPB-08, y OPB-09. Con todos ellos, los patrones de bandas obtenidos permitieron distinguir de forma inequívoca las dos cepas de Fol de las siete de Forl. En la Figura 2 se incluyen los patrones de bandas obtenidos con los cebadores OPB-02 y OPA-09. Con el primer cebador, se aprecia la existencia de una banda de 1550 pares de bases (pb) presente en Fol pero no así en Forl. En las reacciones con el OPA-09, también se aprecia una banda de 2700 pb. específica de Fol. En ambos casos, hay numerosas bandas de Forl que no aparecen en Fol.

Detección del hongo en planta: Un 15 % de las reacciones de amplificación de ADN de plantas inoculadas, junto con la amplificación del hongo y plantas testigos, no dieron resultados concluyentes, debido al fallo parcial o total de la amplificación. El resultado del resto de las reacciones aparece en la Figura 3. Las plantas de tomate no infec-

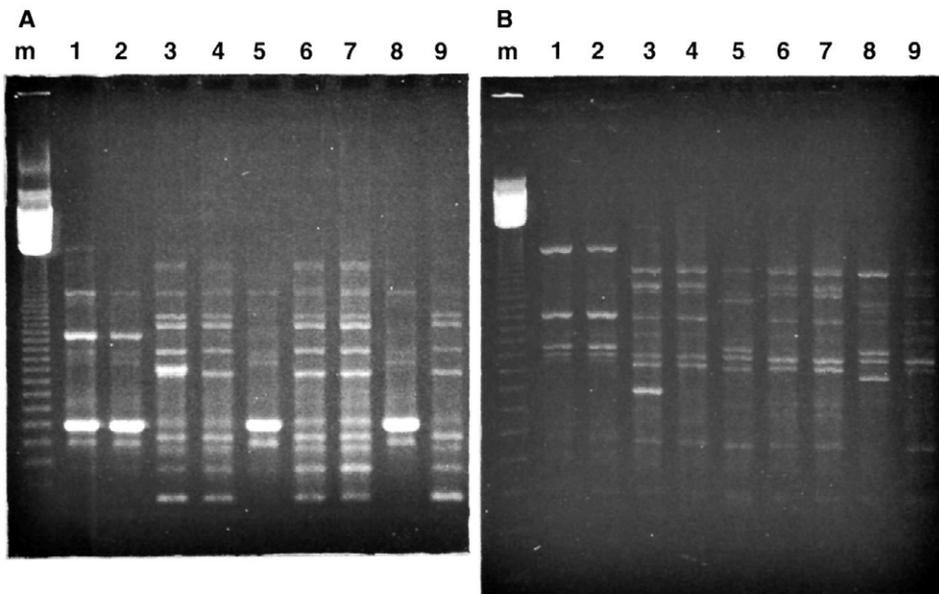


Fig. 2.—Patrones de ADN amplificado de distintas cepas de *F.o. lycopersici* y *F.o. radidis-lycopersici*.

Carril m: Marcador de tamaño molecular. Ladder de 123 pb. Panel A: ADN amplificado con el cebador OPB-02. Panel B: ADN amplificado con el cebador OPA-09. Carril 1: Fol-39; carril 2: Fol-57; carril 3: Forl-1; carril 4: Forl-4; carril 5: Forl-9; carril 6: Forl-12; carril 7: Forl-15; carril 8: Forl-19; carril 9: Forl-25.

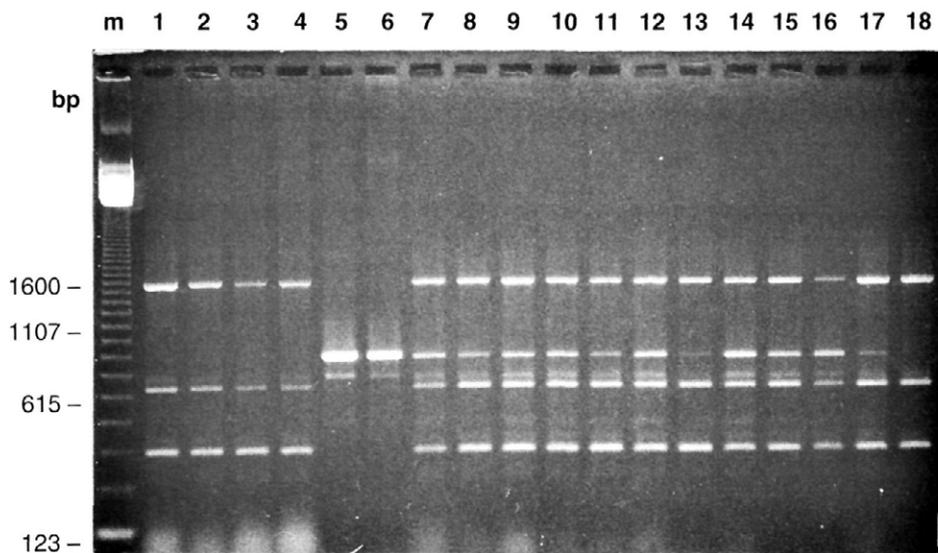


Fig. 3.—Patrones de ADN amplificado con el cebador OPB-02 de plantas sanas e infectadas por *F.o lycopersici*. Carril m: Marcador de tamaño molecular. «Ladder» de 123 pb. Carriles 1 a 4: ADN de cuatro plantas de tomate no infectadas; carriles 5 y 6: Dos repeticiones con ADN de la cepa Fol-245 de *F.o. lycopersici*; carriles 7-17: ADN de plantas infectadas con el hongo, de las cuales se reaisló el mismo; carril 18: ADN de planta inoculada pero de la que no se reaisló el hongo.

tadas mostraron tres bandas intensas, de un tamaño de 1550, 700 y 320 pb y una muy tenue de 730 pb. En las dos reacciones de la cepa del hongo se observó la presencia de dos bandas, una intensa de tamaño 860 pb y una muy tenue de 730 pb. Las plantas infectadas, mostraron tanto las bandas correspondientes al tomate como las correspondientes al hongo. De todas las muestras que mostraron la banda correspondiente al hongo, se aisló el mismo en el medio Komada, mientras que no se aisló en el único caso en que no se detectó la banda del hongo.

DISCUSION

Los resultados presentados, ponen de manifiesto la posibilidad de diferenciar de forma inequívoca las formas especiales *lycopersici* y *radicis-lycopersici* de *Fusarium oxysporum* mediante marcadores RAPD.

Puede objetarse que la muestra de aislamientos del hongo pertenece a una zona geográfica relativamente reducida, y el estudio de nuevos aislados podría producir resultados diferentes. A pesar de ello, el hecho de que los aislados de Fol y Forl se agrupen en dos grandes grupos que ramifican a un nivel de similitud de 65 %, indica que la diferencia genética de las dos formas es apreciable y dentro del rango accesible al análisis de los RAPDs. Estos marcadores se muestran superiores al análisis de isoenzimas para la separación de las dos formas especiales, dado que en un estudio previo con ocho sistemas enzimáticos de 49 cepas de Forl y 19 de Fol, no se detectó ninguna diferencia entre ambas formas (KATAN *et al.*, 1991). No obstante, la relación genética entre dos organismos deducida mediante RAPDs es comparable con la obtenida a través del análisis de isoenzimas, como demuestran MEGNEGNEAU *et al.*, en *Aspergi-*

llus spp. (1993). La posibilidad de distinguir las dos formas será de gran ayuda en estudios epidemiológicos, dado que a partir del aislamiento del hongo, la determinación de su forma especial mediante RAPD implica un período de 4 días, frente a las varias semanas necesarias para la determinación mediante inoculación de plantas. Los resultados obtenidos invitan a pensar que los RAPDs pueden ser utilizables como marcadores de las varias decenas de formas especiales descritas en *F. oxysporum*. Sin embargo, los resultados obtenidos en estudios preliminares con *F.o. melonis*, *F.o. niveum* y *F.o. dianthi* indican que este uso de los RAPD no tiene una validez general. (CENIS *et al.*, en preparación). En estos casos se encuentra más variabilidad dentro de cada una de las formas que entre ellas. En estas condiciones, el uso de los RAPDs es escasamente operativo.

Un hecho interesante que ha puesto de manifiesto el presente estudio es la gran uniformidad genética de los aislamientos de *F.o. lycopersici*. Esto contrasta con los datos obtenidos mediante análisis de isoenzimas, en que se detectaron 34 fenotipos en una colección mundial de 118 aislamientos (ELÍAS y SCHNEIDER, 1992). Por el contrario, la variabilidad detectada en *F.o. radialis-lycopersici* parece mayor de lo que ha sido descrito por otros autores. KATAN *et al.*, (1991), en un estudio de 49 cepas de *F.o. radialis-lycopersici* de Israel y otros siete países, no encuentran ningún polimorfismo enzimático entre ellas trabajando con ocho isoenzimas. Sin embargo el muestreo de las cepas utilizadas en el presente trabajo es inadecuado, por reducido, para extraer conclusiones de los datos de variabilidad.

Los resultados obtenidos en el experimento de detección del hongo en la planta enferma demuestran que los RAPD pueden utilizarse de forma rápida y sencilla en la detección de microorganismos. El concepto de amplificar conjuntamente el ADN de dos organismos y determinar a cual pertenecen las distintas bandas mediante comparación con las de los dos por separado,

también ha sido utilizado para detectar la presencia de parásitos en insectos (GUIRAO *et al.*, 1993). Los RAPDs han sido propuestos con anterioridad para la detección de las razas 1 y 2 de *F. solani* f.sp. *cucurbitae*, a partir del aislamiento de las bandas polimórficas y su utilización como sonda de hibridación en membrana (CROWHURST *et al.*, 1991). El método propuesto aquí es más sencillo, por cuanto suprime la necesidad de aislamiento de la banda y su marcaje radioactivo. Sin embargo, hay algunas importantes limitaciones a considerar. En primer lugar, es esencial incluir controles tanto de la planta sana como del hongo aislado. A su vez, hay que incluir varias cepas diferentes del hongo para contar con la variabilidad que éste pueda mostrar con respecto a la presencia de las bandas que se están utilizando como diagnósticas, a no ser que se tenga la seguridad, obtenida en estudios previos, de que las bandas diagnósticas están conservadas en la especie o forma especial del hongo. También es importante trabajar con el máximo cuidado para evitar la contaminación accidental de las muestras en el laboratorio, que podría dar lugar a falsos positivos, o bien reacciones fallidas, que producen falsos negativos. En este sentido hay que considerar que es inevitable un porcentaje variable de reacciones con resultados poco concluyentes debido al fallo total o parcial de la reacción. En cualquier caso, a pesar de sus presentes limitaciones, este enfoque constituye una línea a desarrollar en el futuro dada su sencillez.

Como conclusión puede afirmarse que los RAPD constituyen una herramienta útil en la distinción de las formas especiales *F.o. lycopersici* y *F.o. radialis-lycopersici*, facilitando así su detección y seguimiento epidemiológico en el suelo. En cuanto a su validez como método general con otras formas especiales, será necesario un estudio más amplio y profundo, para evaluar el efecto de la gran variabilidad de esta especie en este tipo de aplicación.

ABSTRACT

CARBONELL, C.; CIFUENTES, D.; TELLO J. y CENIS, J. L., 1994: Differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F.o.* f. sp. *radicis-lycopersici* and its detection in plant by RAPD markers. *Bol. San. Veg. Plagas*, **20**(4): 919-926.

In this work, it is studied the application of RAPD markers to the differentiation of the formae specialis *lycopersici* (Fol) and *radicis-lycopersici* (Forl) of *Fusarium oxysporum*. The strains used in the study, 32 from Fol and 15 from Forl, were isolated in the tomato-growing area of Aguilas and Mazarrón (Murcia) and Almería. The Fol strains showed a elevated genetic uniformity, grouping in two haplotypes, by contrast with the 10 haplotypes found in the Forl strains. All the 10 primers which gave the best amplifications, produced polymorphisms which allowed the differentiation of the two formae specialis. The RAPDs were also used for the detection of *F.o. lycopersici* in infected tomato plants. By amplification of the DNA extracted from a diseased plant and comparison of the obtained pattern with that of the healthy plant and the isolated fungus, it was possible to identify in the diseased plants a DNA band from the fungus.

Key Words: Random amplified polymorphic DNA, Polymerase Chain Reaction, PCR, Tomato.

REFERENCIAS

- CENIS, J. L., 1992: Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, **20**: 2.380.
- CENIS, J. L.; RODRÍGUEZ, C. y TELLO, J., 1992: Variación molecular de aislamientos españoles del hongo *Rhizoctonia* spp. *Resúmenes VI Congreso Nac de la S.E.F., Torremolinos*: 249.
- CENIS, J. L., 1993: Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology*, **83**: 76-78.
- CROWHURST, R. N.; HAWTHORNE, B. T.; RIKKERINK, H. A. y TEMPLETON, M. D., 1991: Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.*, **20**: 391-396.
- ELIAS, K. S. y SCHNEIDER, R. W., 1992: Genetic diversity within and among races and vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* as determined by isozyme analysis. *Phytopathology*, **82**: 1.421-1.427.
- GRAJAL-MARTIN, M. J.; SIMÓN, C. J. y MUEHLBAUER, F. J., 1993: Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lisi*. *Phytopathology*, **83**: 612-614.
- GUIRAO, P.; BETIA, F. y CENIS, J. L., 1993: Aplicación de la técnica RAPD-PCR a la taxonomía de moscas blancas (Hom.: Aleyrodidae) *Bol. San. Veg. Plagas*, **20**: (En prensa)
- JARVIS, W. R. y SHOEMAKER, R. A., 1978: Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root of tomato. *Phytopathology*, **68**: 1.679-1.680.
- KATAN, T.; ZAMIR, D.; SARFATTI, M. y KATAN, J., 1991: Vegetative compatibility groups and subgroups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*, **81**: 255-262.
- MEGNEGNEAU, B.; DEBETS, F. y HOEKSTRA, R. F., 1993: Genetic variability and relatedness in the complex group of black *Aspergilli* based on random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.*, **23**: 323-329.
- NEI, M. y LI, W. S., 1979: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **76**: 5.269-5.273.
- OUELLET, T. y SEIFERT, K. A., 1993: Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. *Phytopathology*, **83**: 1.003-1.007.
- ROHLF, F. J., 1988: NTSYS-pc: Numerical taxonomy system for the IBM PC microcomputer (and compatibles), version 1.40 Manual. Setauket, New York, U.S.A.: Biostatistics Inc.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. y ARNHEIM, N., 1985: Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnoses of sickle cell anemia. *Science*, **230**: 1.350-1.354.
- TELLO, J. C. y LACASA, A., 1988: «La podredumbre del cuello y de las raíces», causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* nueva enfermedad en los cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) españoles. *Bol. San. Veg. Plagas*, **14**: 307-312.
- TELLO, J. C. y LACASA, A., 1990: *Fusarium oxysporum* en los cultivos intensivos del litoral mediterráneo de España. Fases parasitaria (*fusariosis* vasculares del tomate y del clavel) y no parasitaria. *Bol. San. Veg. Plagas*, Fuera de Serie, **19**: 190 pp.
- WILLIAMS, G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. y TINGEY, S. V., 1990: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 6.531-6.535.

(Aceptado para su publicación: 4 Enero 1994)