



VARIACIONES ISOENZIMÁTICA Y PATOGENICA DE *Fusarium* spp. ASOCIADAS CON LA PUDRICIÓN DE TALLO Y RAÍZ DE VAINILLA

[ISOZYMIC AND PATHOGENIC VARIATIONS OF *Fusarium* spp. ASSOCIATED WITH VANILLA STEM AND ROOT ROTTING]

Jacel Adame-García^{1,2}, Ángel R. Trigos-Landa³, Lourdes G. Iglesias-Andreu¹, Norma Flores-Estevez¹, Mauricio Luna-Rodríguez^{3*}

¹Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada. Apdo. Postal 250, Xalapa, Veracruz. México. jadameg@gmail.com, xliglesias@gmail.com, nflores@uv.mx

²Instituto Tecnológico de Úrsulo Galván. Km. 4.5 Carretera Cardel-Chachalacas, CP. 91667, Úrsulo Galván, Veracruz. México.

³Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa. Calle Médicos No. 5 Col. Unidad del Bosque, CP. 91010, Xalapa, Veracruz. México. atrigos@uv.mx.

*Autor para correspondencia: mluna@uv.mx

RESUMEN

Se determinaron las variaciones patogénica e isoenzimática de aislamientos de *Fusarium* spp. asociadas con la pudrición de tallo y raíz de un cultivar de vainilla en la región del Totonacapan, Veracruz, México. Los patrones de patogenicidad y los perfiles de bandas esterases de los aislamientos evaluados demostraron que no sólo existe variabilidad morfológica y patogénica, sino también un alto grado de variabilidad bioquímica dentro de los hongos causantes de la pudrición de tallo de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. La producción de algunas esterases (banda Rf = 0.75) al parecer está asociada con el grado de patogenicidad de los hongos, ya que no se detectó su presencia en los aislamientos que resultaron no patogénicos para este cultivo. Este marcador bioquímico podría ser una alternativa rápida, confiable y económica, con relación a otras tecnologías moleculares ya establecidas para evaluar el grado de patogenicidad de *Fusarium* spp. en *V. planifolia*, así como de otras especies o razas de este género, causantes de la pudrición de tallo y raíz en el cultivo.

Palabras clave: Variabilidad; esterases; patogenicidad; *Vanilla planifolia*.

INTRODUCCIÓN

El género *Fusarium* comprende un grupo amplio y heterogéneo de especies de hongos con gran importancia como contaminantes de alimentos en la industria y como agentes patogénicos en la agricultura (Manicom *et al.*, 1987). Dentro de las especies

SUMMARY

This study determined the pathogenic and isozymic variations of *Fusarium* spp. isolates associated with the stem and root rotting of a vanilla cultivar in the Totonacapan region, Veracruz, Mexico. Pathogenicity patterns and esterase isozymes profiles of the isolates evaluated revealed that not only morphological and pathogenic variability exists, but also a high level of biochemical variability within the fungi responsible for stem rotting in *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews. The production of some esterases (band Rf = 0.75) appears to be associated with the pathogenicity of the fungi, since their presence was not detected in the isolates that were non pathogenic to the crop. This biochemical marker might be a fast, reliable and inexpensive alternative, in relation with other well established molecular technologies, to assess the pathogenicity of *Fusarium* spp. in *V. planifolia*, as well as other species or races of this genus that cause stem and root rotting in the crop.

Key words: Variability; esterases; pathogenicity; *Vanilla planifolia*.

fitopatógenas de *Fusarium* se presentan formas especiales que requieren ser identificadas a detalle. Durante años, la identificación de las especies de *Fusarium* y sus razas se ha basado en la especificidad del hospedero (Puhalla, 1985), al igual que en las características morfológicas de las estructuras reproductivas (Summerell *et al.*, 2003). No obstante,

no es posible identificar las especies de *Fusarium* empleando sólo la morfología de las estructuras reproductivas, debido a que las condiciones ambientales afectan su expresión, y repercuten en la presencia, tamaño y/o forma de las esporas (Puhalla, 1985; Leslie y Summerell, 2006). Complementariamente, se han empleado marcadores bioquímicos basados en la variación en los patrones de bandas de proteínas (Annis y Goodwin, 1997) e isoenzimas (Bonde *et al.*, 1993), además de inmunolectogramas (Iannelli *et al.*, 1983), reacciones de anticuerpos monoclonales (Abd-el-Rehim y Fadel, 1980) y más recientemente, diversos tipos de marcadores moleculares (Narayanasamy, 2008).

Si bien las isoenzimas han sido utilizadas para distinguir la taxa de numerosos hongos y la relación que guardan con otras especies fúngicas, también han mostrado ser útiles para distinguir la variación presente entre cepas patogénicas y no patogénicas. Las variantes isoenzimáticas, al igual que otras proteínas, juegan roles importantes para la adquisición de nutrientes, colonización del sustrato e interacciones ecológicas (Walton, 1994; De Vries, 2003). Es por ello que las variantes electroforéticas de isoenzimas han resultado ser una herramienta eficiente para determinar la identidad de patógenos fúngicos (Elias y Schneider, 1992; Bonde *et al.*, 1993; Huss *et al.*, 1996). Entre las isoenzimas que más se han ocupado con este fin se encuentran las esterazas. Éstas son enzimas hidrolasas que tienen como función romper los enlaces éster presentes en la estructura de hemicelulosa y de pectina de las paredes celulares de las plantas, ayudando así a que los hongos saprófitos y patógenos puedan degradarlas y utilizar los contenidos celulares como nutrientes (Mendgen *et al.*, 1996; Williamson *et al.*, 1998). Para la identificación de cepas de hongos patogénicos, además de las esterazas se ha demostrado la utilidad de otras isoenzimas, como las fosfatasas y las deshidrogenasas (Narayanasamy, 2008).

Por otra parte, debido a su origen clonal y a su propagación vegetativa, la vainilla cultivada presenta una base genética estrecha (Mino *et al.*, 2008), lo que la convierte en una especie susceptible a un gran número de enfermedades causadas principalmente por patógenos como *Fusarium oxysporum* (Alconero, 1968), *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. (Talubnak y Soyong, 2010) y *Phytophthora* sp. (Bhai y Thomas, 2000). *Fusarium* es el género más estudiado entre los que causan enfermedades en el cultivo. Se han aislado doce especies de este género asociadas con la enfermedad (Pinaría *et al.*, 2010). No obstante, se considera que *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*

es el agente causal de dicha enfermedad, dada su amplia distribución en áreas donde crece y se cultiva vainilla (Alconero, 1968; Liew *et al.*, 2004; Pinaría *et al.*, 2010). Este hongo muestra un alto nivel de especificidad y se clasifica en más de 120 formas especiales y razas (Summerell *et al.*, 2003). Pese a la importancia de *F. oxysporum* en vainilla, no se ha evaluado la patogenicidad ni se han realizado análisis moleculares entre los miembros conocidos de *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* (Summerell *et al.*, 2011). El objetivo de este trabajo fue comparar los niveles de patogenicidad entre los aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos a partir de tallo y raíz de vainilla con síntomas de pudrición, para analizar si las variantes esterazas detectadas en estos aislamientos se pueden asociar con la patogenicidad expresada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de hongos

El material biológico se obtuvo de una huerta de vainilla localizada en la comunidad de Francisco Sarabia, Papantla, Ver. (20° 21' Lat. N y 97° 30' Long. O). Se colectaron muestras de tejidos (tallo, raíz y hoja) de vainilla que presentaban pudrición. Éstas fueron procesadas en el Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa S. C., con el propósito de aislar los hongos presentes. Las muestras se lavaron con agua corriente y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % durante 1 min. Posteriormente, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. De la zona circundante al daño se tomaron dos fragmentos de tejido (~5x5 mm) y se colocaron en cajas Petri que contenían medio de cultivo. Se emplearon dos tipos de medio de cultivo: papa-dextrosa-agar (PDA) (DIBICO) y Czapek dox (Bioxon). Las cajas se colocaron en incubadora microbiológica (BG Mod E-71) a 25±1 °C hasta observar desarrollo micelial (24-36 h). Un fragmento de micelio se transfirió con un asa de siembra microbiológica a medio PDA y se incubó a 25±1 °C durante 5 días o hasta la producción de esporas, con las que se preparó una suspensión en agua destilada estéril. Con la ayuda del microscopio (Carl Zeiss, AxioStar) se seleccionaron tres esporas y se sembraron individualmente en medio PDA para obtener cultivos puros (Leslie y Summerell, 2006). Los hongos aislados se identificaron morfológicamente a nivel de género.

Pruebas de patogenicidad

Para las pruebas de patogenicidad se empleó un diseño completamente aleatorizado, con cinco repeticiones, realizado en dos ocasiones. Se colectaron hojas de

vainilla sanas, se lavaron con solución de jabón líquido y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 min. Posteriormente, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. En cada hoja se colocó un fragmento (~5 mm de diámetro) de medio de cultivo PDA más micelio de cada aislamiento de siete días de incubación a 25 ± 1 °C. Como testigo se emplearon hojas de vainilla sanas con un fragmento de medio sin micelio. Las hojas se incubaron en cámara húmeda a 25 ± 1 °C, con 100 % de humedad relativa durante 12 días. El nivel de patogenicidad se determinó mediante el porcentaje de daño en las hojas, considerando el área de la zona dañada (cm^2) con respecto al área total de la hoja, medidos con un determinador de área foliar (3100 LI-COR). Con los porcentajes de daño resultantes se establecieron tres niveles de patogenicidad: 1) No patogénicos, aislamientos que no dañaron las hojas (0 %); 2) Patogenicidad moderada, daño menor a 30 % respecto al área total de la hoja; y 3) Altamente patogénicos, aislamientos que provocaron daño en más de 30 % del área de la hoja.

Análisis isoenzimáticos

Los análisis isoenzimáticos se llevaron a cabo a partir de cultivos de *Fusarium* spp. de tres periodos de desarrollo (4, 8 y 12 días) en medio PDA crecidos a 25 ± 1 °C.

Extracción de proteínas

Una vez concluida cada etapa de crecimiento, se transfirieron 0.5 g del micelio desarrollado en la superficie del medio a un tubo de ensayo que contenía 1 mL de solución amortiguadora de extracción [0.2 M de KH_2PO_4 pH 7.5, 10 % PVP-40 (Sigma), 0.1 % β -mercaptoetanol (Promega) y 0.3 % albúmina de huevo (Hycl) (Conkle *et al.*, 1982). El micelio se maceró con un homogeneizador de varilla (OMNI TH) y posteriormente se centrifugó a 13000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido de cada muestra se transfirió a un tubo estéril y se guardó a -20 °C hasta su uso en la separación electroforética.

Electroforesis

La separación electroforética de proteínas se realizó en un sistema discontinuo de geles de poli(acrilamida) (PAGE) (Davis, 1964; Ornstein, 1964) adaptado a la técnica de lámina vertical. Para ello, se colocaron 50 μL de muestra en geles de poli(acrilamida) de 5 % para la zona de compactación y de 8.5 % para la de separación y de 1 mm de grosor. Como tampón de corrida se utilizó una solución de Tris-Glicina (tris

base 0.009 M, glicina 0.07 M), pH 8.3 (Maheswaran y Sree Rangasamy, 1988). El corrimiento se efectuó a 45 mA durante 2 h, con una fuente de poder (Consort E714).

Tinción de isoenzimas esterazas

Después de concluida la separación electroforética, los geles se incubaron en 50 mL de ácido bórico 0.5 M, durante 25 min, a 4 °C. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada estéril y se colocaron en solución de tinción [50 mL de tampón fosfato: 0.13 M NaH_2PO_4 y 0.12 M de Na_2HPO_4 , pH 5.9, 2 mL de 1 naftil acetato al 2 % (Sigma), 1 mL de 2-naftil acetato 1 % (Sigma) y 80 mg de Fast Blue RR (Sigma)] (Hebert y Beaton, 1993). Concluida la tinción, los geles se lavaron con agua destilada y se almacenaron en solución fijadora (ácido acético 7%). Los geles se fotografiaron con una cámara fotográfica (Olympus Stylus 850 SW), sobre un transiluminador de luz blanca. Los patrones de bandas obtenidos se registraron con base en el número y movilidad relativa (R_f) de cada una de las bandas reveladas.

Análisis de datos

Los datos obtenidos en la prueba de patogenicidad se procesaron mediante un análisis de varianza, seguido de separación de medias (Tukey, $P = 0.05$). Los geles se analizaron mediante una matriz binaria, donde el valor 0 se asignó a los casos de ausencia de bandas y el valor 1 para la presencia. Sobre esta base se realizó un análisis de conglomerado de clasificación jerárquica (coeficiente de Jaccard) y el método UPGMA como algoritmo de ligamiento para la clasificación de las cepas, empleando el programa NTSYT v. 2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de hongos fitopatógenos

A partir de las muestras de tejido de vainilla dañado se obtuvieron 189 crecimientos fúngicos que, de acuerdo con sus características macroscópicas, correspondieron a los géneros *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006) y *Colletotrichum* (Barnett y Hunter, 1998). Los aislamientos de *Fusarium* desarrollados en medio PDA presentaron variación en las características macroscópicas coloniales (color y textura), lo que permitió ordenarlos en seis grupos distintos (datos no mostrados). Las observaciones microscópicas mostraron estructuras típicas del género *Fusarium*, como son la presencia de macro y microconidios (Leslie y Summerell, 2006). Debido a que *Fusarium* es

el único género que se sabe causa pudrición y marchitez de tallo y raíz en vainilla (Alconero, 1968), la determinación de la variabilidad patogénica e isoenzimática se centró exclusivamente en aislamientos de este género. Para ello se consideraron a los seis grupos distintivos por sus características macroscópicas coloniales.

Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad mostraron diferencias significativas ($F = 34.06$, $P < 0.001$) en la capacidad patogénica de los aislamientos. De los seis aislamientos de *Fusarium* spp. evaluados, dos resultaron altamente patogénicos (H2, H3) al dañar la hoja en más de 30 % (Figura 1). El aislamiento H2 presentó el mayor grado de patogenicidad (Figura 2).

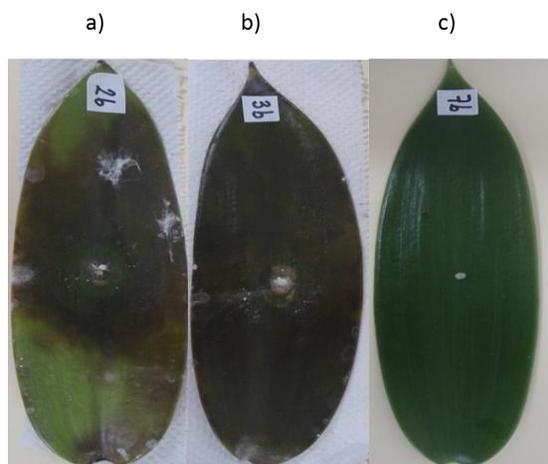


Figura 1. Daños provocados por los aislamientos de *Fusarium* spp. a hojas de vainilla 12 días después de inoculados: a) Aislamiento H2; b) Aislamiento H3; c) Testigo.

Por otra parte, los aislamientos H1, H4 y H6 mostraron niveles de patogenicidad moderada, ya que menos de 30 % de la hoja presentó síntomas de la enfermedad. No se observaron diferencias significativas entre estos aislamientos. El aislamiento H5 no causó daño a los tejidos de vainilla y se consideró un aislamiento no patogénico (Figura 2).

Una característica del género *Fusarium* es su gran variabilidad patogénica dentro de las especies, misma que se manifiesta en la existencia de numerosas razas fisiológicas (Andres *et al.*, 2001). Tombe *et al.* (1993) y Pinaría *et al.* (2010), mencionan que existe un amplio rango de especies de *Fusarium* asociadas con la pudrición de tallo en Indonesia, sin embargo,

atribuyen la enfermedad a *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. Adicionalmente Pinaría *et al.* (2010) consideran que las especies *F. pseudocircinatum*, *F. napiforme* y *F. polyphialidicum* son saprófitas o colonizadoras endofíticas de la vainilla. Lo anterior pudiera explicar los resultados de este trabajo. No obstante, se requieren estudios adicionales que profundicen en el conocimiento de la base genética de *Fusarium* spp., cohabitante con los cultivos de vainilla en México. De esta forma se podría precisar su identidad y su variabilidad, ya que según Ploetz (2006), a pesar de que en el trópico se han realizado numerosas investigaciones enfocadas a estudiar las enfermedades causadas por *Fusarium* spp., se ha dado poca atención a las que ocurren en hospederos perennes, como el caso de vainilla.

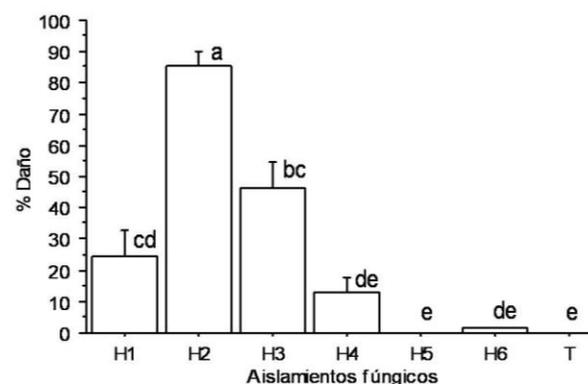


Figura 2. Variación en capacidad patogénica de seis aislamientos de *Fusarium* spp. 12 días después de inoculados (H1-H6 = seis aislamientos; T- testigo). Barras = error estándar (5 rep.). Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey, $P < 0.05$).

Análisis isoenzimáticos

Los análisis isoenzimáticos a los cuatro días de incubación de los hongos revelaron cuatro patrones distintivos de actividad esterasa: 1) H1; 2) H2; 3) H3 y H4; 4) H5 y H6 (Figura 3a). Resalta la similitud entre los aislamientos H3 y H4, dada la presencia de dos bandas monomórficas comunes, además de que no se detectaron variantes esterasas en los aislamientos H5 y H6. A los ocho días de desarrollo fúngico, se distingue el aislamiento H2 con mayor actividad esterasa, por presentar cuatro nuevas bandas con respecto a la primera etapa de crecimiento. Dos de estas bandas, con valores de Rf de 0.65 y 0.75, resultaron distintivas para el aislamiento H2, mientras que la banda con Rf 0.70 resultó monomórfica con el aislamiento H1. Continuaron sin apreciarse, en esta etapa, bandas

esterasas en los aislamientos H5 y H6 (Figura 3b). A los doce días se observaron seis bandas de actividad esterasa, las cuales resultaron polimórficas (100 %). Fue hasta este periodo cuando la presencia de bandas esterasas en H5 y H6 resultaron distintivas para diferenciar los aislamientos (Figura 3c, Figura 4). Por

otro lado, aún con la aparición de una nueva banda esterasa (valor Rf 0.75) en H3 y H4, estos aislamientos continuaron sin diferenciarse entre ellos (Figura 3c, Figura 4), lo que denota que existe una notable similitud genética entre los mismos.

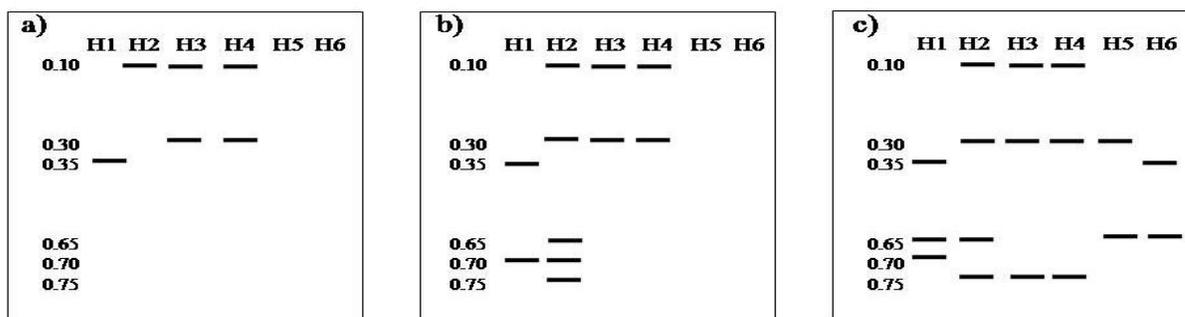


Figura 3. Zimograma donde se representa la movilidad relativa (Rf) de las bandas de esterasas producidas por los aislamientos de *Fusarium* spp.: a) cuatro, b) ocho, y c) doce días de incubación a 25±1 °C en medio PDA. Números en encabezado corresponden a los aislamientos y los verticales al valor de Rf.

La presencia de bandas fuertemente teñidas (Rf 0.70 y 0.75) en el aislamiento H2 a los ocho días de incubación (Figura 4), coincidió con el momento de inicio del proceso patogénico en las muestras de tejidos evaluadas en las pruebas de patogenicidad.

que presentaron mayor patogenicidad (H2, H3 y H4); el grupo II por aislamientos moderadamente patogénicos (H1 y H6), y el grupo III por el aislamiento no patogénico (H5).

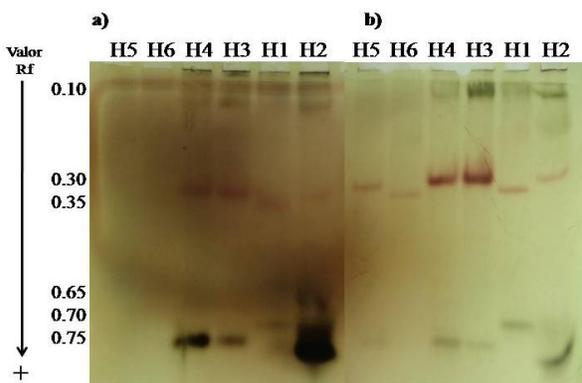


Figura 4. Perfiles electroforéticos en gel de poliacrilamida de isoformas esterasas producidos por los aislamientos de *Fusarium* spp.: a) ocho, y b) doce días de incubación a 25±1 °C en medio PDA. Números en encabezado corresponden a los aislamientos y los verticales al valor de Rf.

Si bien el aislamiento H5 (no patogénico) pudo separarse del resto de los aislamientos que sí presentaron un grado de patogenicidad, se observó que presenta similitud con el grupo I (aislamientos más patogénicos), lo que está dado por la banda Rf = 0.30, presente en los cuatro aislamientos en cuestión. En cambio, el grupo de aislamientos patogénicos se caracterizaron por tener una banda (Rf = 0.75), no presente en H5 ni en el resto de los aislamientos. Con base en lo anterior, las bandas encontradas pudieran tener valor diagnóstico para futuros trabajos de patogenicidad relacionados con la pudrición de la raíz y tallo de vainilla. Se sabe que los aislamientos fitopatógenos de *Fusarium solani* f. sp. *pisi* presentan dos isoenzimas de cutinasa y una esterasa no específica en su fluido extracelular, las cuales están relacionadas con su grado de patogenicidad (Purdy y Kolattukudy, 1975), por lo que en algunos casos se puede encontrar una clara correlación entre la actividad isoenzimática y el grado de patogenicidad (Liu y Sinclair, 1992; 1993; Laroche *et al.*, 1992; Neeraja *et al.*, 2002).

De acuerdo con el análisis de conglomerados, a los doce días de desarrollo se observan tres grupos (Figura 5), donde el grupo I se conformó por los aislamientos

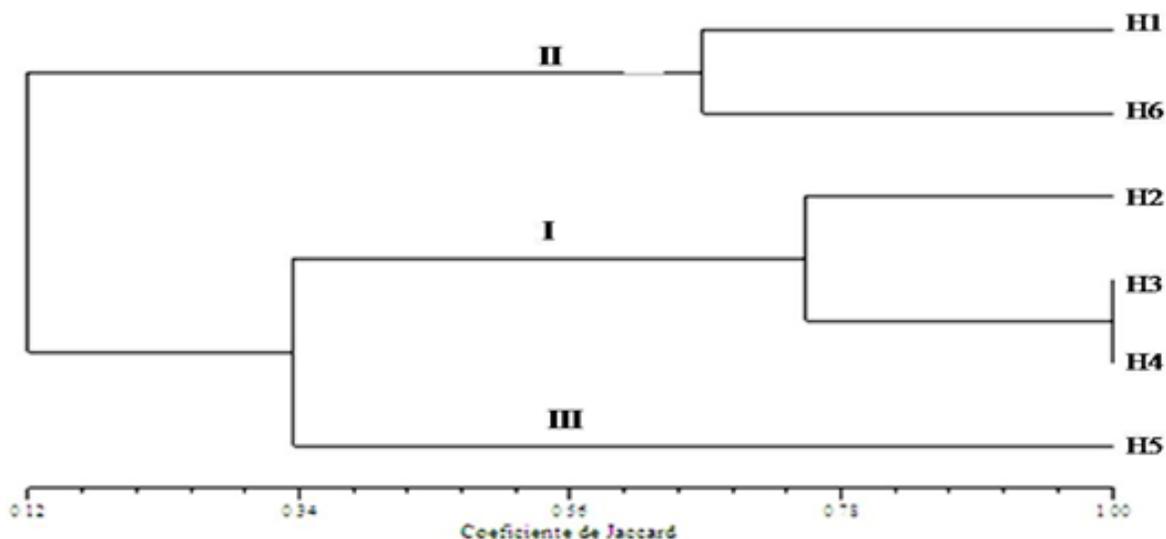


Figura 5. Dendrograma del análisis de conglomerado efectuado a los datos de bandas de actividad esterasa de los aislamientos de *Fusarium* spp., cultivados en medio PDA durante doce días.

Por otra parte, el uso de isoenzimas esterasas ha resultado de gran utilidad para distinguir diferentes aislamientos de especies relativamente cercanas de *Fusarium*, dado que los patrones isoenzimáticos obtenidos permiten conocer la relación genética existente entre aislamientos, aunque sus características morfológicas sean distintas. Al respecto, Laday y Szècsi (2001), realizaron un estudio intraespecífico de *Fusarium* spp., en el cual los patrones isoenzimáticos mostraron que *F. graminearum* está más cercanamente relacionado con *F. cerealis* y *F. culmorum* que con *F. pseudograminearum*; sin embargo, la similitud morfológica de *F. graminearum* y *F. pseudograminearum* no refleja su diversidad genética.

CONCLUSIÓN

La variabilidad patogénica exhibida por los aislamientos de *Fusarium* spp. en hojas de vainilla y el alto polimorfismo de isoformas esterasas que presentan, resultan de utilidad para futuros estudios taxonómicos. El análisis de isoformas esterasas podría resultar de valor diagnóstico para el grado de patogenicidad, en especial la variante de esterasas (banda Rf = 0.75) presente en los aislamientos altamente patogénicos (H2, H3 y H4). La variabilidad isoenzimática y patogénica de *Fusarium* spp. en vainilla, podría ayudar al establecimiento de estrategias que hagan eficiente el manejo de este patógeno en los cultivos establecidos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Dirección General de Educación Superior Tecnológica (DGEST), por la beca y la licencia por beca-comisión, asignadas a Jacel Adame-García para la realización de sus estudios de doctorado en el Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA) de la Universidad Veracruzana.

REFERENCIAS

- Abd-el-Rehim, A., Fadel, F. M. 1980. Immunoelectrophoretical differences between phytopathogenic *Fusarium* species. *Biochemical Systematics and Ecology*. 8: 7-9.
- Alconero, R. 1968. Infection and development of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae* in vanilla roots. *Phytopathology*. 58: 1281-1283.
- Andres, J. L., Vicente, M. J., Cenis, J. L., Collar, J., Tello, J., Cifuentes, D. 2001. Variación genética y patogénica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* en España. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas*. 27: 249-257.
- Annis, S. L., Goodwin, P. H. 1997. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant

- pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 103: 1-14.
- Barnett, H. L., Hunter, B. B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th Ed. American Phytopathological Society Press. USA.
- Bhai, R. S., Thomas, J. 2000. Phytophthora rot a new disease of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in India. *Journal of Spices and Aromatic Crops*. 9: 73-75.
- Bonde, M. R., Micales, J. A., Peterson, G. L. 1993. The use of isozyme analysis for identification of plant-pathogenic fungi. *Plant Disease*. 77: 961-968.
- Conkle, M. T., Hodgskiss, P. D., Nunnally, L. B., Hunter, S. C. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. General Technical Report PSW-64. USA.
- Davis, B. 1964. Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 121: 31-39.
- De Vries, R. P. 2003. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 10-20.
- Elias, K. S., 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: 1421-1427.
- Hebert, P. D. N., Beaton, M. J. 1993. Methodologies for Aallozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis. Helena Laboratories. USA.
- Huss, M. J., Campbell, C. L., Jennings, D. B., Leslie, J. F. 1996. Isozyme variation among Biological Species in the *Gibberella fujikuroi* Species Complex (*Fusarium* Section *Liseola*). *Applied Environmental Microbiology*. 62: 3750-3756.
- Iannelli, D., Capparelli, R., Marziano, F., Scala, F., Noviello, C. 1983. Production of hybridomas secreting monoclonal antibodies to the genus *Fusarium*. *Mycotaxon*. 17: 523-532.
- Làday, M., Szècsi, A. 2001. Distinct electrophoretic isozyme profiles of *Fusarium graminearum* and closely related species. *Systematic and Applied Microbiology*. 24: 67-75.
- Laroche, J. P., Jabaji-Hare, S. H., Charest, P. M. 1992. Differentiation of two anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by isozyme analysis. *Phytopathology*. 82: 1387-1393.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A. 2006. *Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. USA.
- Liew, E. C. Y., Rondonuwu, F., Pinaria, A., Sembel, D. T., Summerell, B. A., Burgess, L. 2004. *Fusarium* stem rot of vanilla in North Sulawesi. (Abstr.) *Phytopathology*. 94: S61.
- Liu, Z. L., Sinclair, J. B. 1992. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2. *Phytopathology*. 82: 778-787.
- Liu, Z. L., Sinclair, J. B. 1993. Differentiation intraspecific groups within anastomosis group 1 of *Rhizoctonia solani* using ribosomal DNA internal transcribed spacers and isozyme comparison. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 15: 272-280.
- Maheswaran, M., Sree Rangasamy, S. R. 1988. Genotypic relationship in *Oryza* species under *in vitro* conditions: Use of esterase isozymes as markers during morphogenesis. *Genetic Agronomy*. 42: 365-370.
- Manicom, B. Q., Bar-Joseph, M., Rosner, A., Vigodsky-Hass, H., Kotze, J. M. 1987. Potential applications of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of the fusaria. *Phytopathology*. 77: 669-672.
- Mendgen, K., Hahn, M., Deising, H. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*. 34: 364-386.
- Minoo, D., Jayakumar, V. N., Veena, S. S., Vimala, J., Basha, A., Saji, K. V., Nirmal Babu, K., Peter, K. V. 2008. Genetic variations and interrelationships in *Vanilla planifolia* and few related species as expressed by RAPD polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 55: 459-470.

- Narayanasamy, P. 2008. Molecular techniques for detection of microbial pathogens. *In*: Narayanasamy, P. (ed.). *Molecular Biology in Plant Pathogenesis and Disease Management: Microbial Plant Pathogen*. Springer. Netherlands. pp. 7-158.
- Neeraja, C. N., Shenoy, V. V., Reddy, C. S., Sarma, N. P. 2002. Isozyme polymorphism and virulence of Indian isolates of the rice sheath blight fungus. *Mycopathologia*. 156: 101-108.
- Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis. background and theory. *Annals of the New York Academy of Science*. 121: 321-349.
- Pinaria, A. G., Liew, Y., Burgess, L. W. 2010. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. *Australasian Plant Pathology*. 39: 176-183.
- Ploetz, R. C. 2006. *Fusarium*-induced diseases of tropical, perennial crops. *Phytopathology*. 96: 648-652.
- Puhalla, J. E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*. 63: 179-183.
- Purdy, R. E., Kolattukudy, P. E. 1975. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, and molecular weight of two isozymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani* f. *pisi*. *Biochemistry*. 14: 2824-2831.
- Summerell, B. A., Salleh, B., Leslie, J. F. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*. 87: 117-128.
- Summerell, B. A., Leslie, J. F., Liew, E. C. Y., Laurence M. H., Bullock, S., Petrovic, T., Bentley A. R., Howard, C. G., Peterson, S. A., Walsh, J. L., Burgess L. W. 2011. *Fusarium* species associated with plants in Australia. *Fungal Diversity*. 46: 1-27.
- Talubnak, C., Soyong, K. 2010. Biological control of vanilla anthracnose using *Emericella nidulans*. *Journal of Agricultural Technology*. 6: 47-55.
- Tombe, M., Komoto, Y., Tezuka, N. 1993. Identification and cultural types of *Fusarium* isolates from Vanilla in Indonesia. *Industrial Crop Research Journal*. 6: 1-5.
- Williamson, G., Kroon, A. P., Faulds, B. C. 1998. Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. *Microbiology*. 144: 2011-2023.

Submitted February 02, 2011 – Accepted May 05, 2011
Revised received May 31, 2011