

COMPARACIONES ENTRE AISLAMIENTOS DE *Diplodia* SPP. PROCEDENTES DE HOSPEDEROS FORESTALES POR METODOS TRADICIONALES E INMUNOLOGICOS

ROSA MARIA ALONSO*, PILAR PEREZ', ILEANA PELAEZ'. Y
ANA ISABEL FERNANDEZ**.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es el estudio del comportamiento de aislamientos de *Diplodia natalensis* Pole Evans y *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx; Fl. Flandes de distintas procedencias en cuatro medios de cultivo y dos temperaturas como método tradicional; además, se establecieron relaciones inmunológicas entre ellos. Se determinó que existen diferencias entre los aislamientos, lo que reviste gran importancia en el desarrollo del diagnóstico y control de enfermedades forestales.

Manuscrito recibido 24 de julio de 1984

'Centro de Investigacion Forestal. Ministerio de la Agricultura,
Ciudad de La Habana, Cuba Habana,

*Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana. Cuba

**Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de la
Agricultura Tropical. Academia de Ciencias de Cuba,
Ciudad de La Habana. Cuba

INTRODUCCION

Los estudios taxonómicos y los métodos de diagnóstico en Micología se basan, tradicionalmente, en procedimientos largos, laboriosos y sujetos a las variaciones del patógeno, en dependencia de las condiciones de trabajo (Morton y Dukes, 1966).

Experiencias realizadas recientemente, en la caracterización de microorganismos por diferentes investigadores nos indican la importancia de las pruebas serológicas como métodos eficaces y más rápidos en unibn de los estudios tradicionales.

En Fitopatología estos trabajos revisten mayor importancia, fundamentalmente en la rama forestal, debido a que los aislamientos de patógenos fungosos en troncos y el desarrollo de su ciclo vital, se dificultan con frecuencia por ser éstas, plantaciones perennes donde los síntomas en general no son enteramente específicos y sólo se desarrollan en un estado avanzado de la enfermedad, después que el sistema vascular del árbol está colonizado por el patógeno, siendo necesario el aislamiento del mismo para la confirmación del diagnóstico.

Tempel (1959), realizó investigaciones serológicas en seis formas especiales del género *Fusarium*, y obtuvo diferencias serológicas que ayudaron a determinar razas fisiológicas.

Por otra parte, Dorworth con diferentes colaboradores (1973, 1975, 1977, 1982) estudiaron serológicamente el comportamiento del hongo *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) Morelet (= *Scleroderrisi lagerbergii* Gremmen) causante del cáncer y muerte regresiva en *Pinus* spp., y determinaron que ha sido introducida una raza europea o ha sufrido mutación la raza norteamericana, causando éstas pérdidas en plantaciones de pino en el momento de estudio. A su vez, Wendler et al. (1980) descubrieron un nuevo serotipo de *G. abietina* comparando aislamientos de distintas procedencias.

Ya en 1982, Liese y Gotlieb diagnostican el **cáncer** de coníferas ocasionado por *G. abietina* utilizando la técnica inmunoenzimática **ELISA**.

El presente trabajo tiene como objetivo comenzar un estudio comparativo entre aislamientos de *Diplodia* spp. procedentes de hospederos forestales por métodos tradicionales e inmunológicos, con vistas a desarrollar el diagnóstico y control de enfermedades, así como establecer relaciones comparativas entre los distintos aislamientos y obtener en un futuro posibles razas o biotipos de utilidad en trabajos de diagnóstico y resistencia a enfermedades.

MATERIALES Y METODOS

Aislamientos

Los distintos aislamientos de Diplodia natalensis y Diplodia, se obtuvieron a partir de Cedrela odorata L. y Pinus tropicalis Morelet, respectivamente. En la Tabla 1 se muestran en detalle las diferentes procedencias y fechas de colectas de los aislados del género Diplodia. De todos ellos se realizaron cultivos monospóricos con la cuales se trabajó.

Métodos tradicionales de trabajo

Los cultivos monospóricos mantenidos en cuñas de agar malta (Oxoid) fueron transferidos a placas de Petri (100 mm x 15 mm), y el hongo se recultivó a partir de discos miceliales de 0,4 cm de diámetro en cuatro medios de cultivo sintéticos (Oxoid): malta (M1), PDA (M2) Czapek (M3) y Sabouraud (M4). Los mismos fueron incubados a dos temperaturas diferentes, 20 ± 2 (T1) y 28 ± 2 °C (T2), manteniendo la humedad relativa constante (80 ± 5 %). El crecimiento de las colonias fue medido linealmente durante cuatro días, hasta que las primeras cubrieron la superficie de la placa. Además de las medidas de crecimiento se hicieron observaciones fenológicas de las colonias. La comparación de los datos se realizó por un modelo trifactorial ($2 \times 4 \times 4$), hallándose la significación por la prueba de rangos múltiples de Duncan (1965).

Métodos serológicos de trabajo

Obtención de los antígenos

Los antígenos (Ag) de los cuatro aislamientos estudiados se prepararon con cultivos de nueve días de crecimiento en medio líquido de papa dextrosa con sulfato de amonio al 0,2 % (Pérez-Fernández, 1982).

La masa micelial fue recogida por filtración, lavada con H₂O destilada, congelada durante 24 horas y desintegrada en morteros enfriados previamente, con un volumen mínimo de una solución de bicarbonato de sodio 0,004 M. Posteriormente, se filtró a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó a 4 000 rpm durante 15 minutos.

TABLA 1. Orígenes de aislamientos de Diplodia spp.

Aislamiento	Taxon Hospedero	Localidad	Provincia	Fecha colecta	Nomenclatura
<u>D. pinea</u> (Desm.) Kickx Flandres	<u>Pinus tropi- calis</u> Morelet	Isla de la Juventud La Victoria	La Habana	Diciembre/82	P
<u>D. natalensis</u> Pole Evans	<u>Cedrela</u> <u>odorata</u> L.	II Frente Tumba 7	Gramna	Marzo/82	CI
<u>D. natalensis</u> Pole Evans	<u>Cedrela</u> <u>odorata</u> L.	T. de Collan tes La Jorobada	S. Spíritus	Febrero/82	CII
<u>D. natalensis</u> Pole Evans	<u>Cedrela</u> <u>odorata</u> L.	Baracoa Naranjal del Toa	Guantánamo	Abril/82	CIII

El sobrenadante recogido se concentró en membrana de diálisis con azúcar turbinada común hasta obtener una concentración de, aproximadamente, 12 mg/ml.

Obtención de los antisueros

Los antisueros (**As**) se obtuvieron a partir de los aislamientos P y CI inmunizándose dos conejos grises de 2 kg de peso, con un mililitro de la solución antigénica, mezclada con un mililitro de adyuvante completo de Freund. Las inoculaciones se realizaron semanalmente hasta un total de ocho. Para comprobar la efectividad de las inmunizaciones se realizó una extracción sanguínea de la vena marginal de la oreja del animal antes de la sexta inoculación. El conejo fue desangrado por punción intracardiaca obteniéndose el suero hiperinmune, al que se le añadió azida sódica como preservativo, y se almacenó a -20°C (Figura 1).

1 ^{ra}	2 ^{da}	3 ^{ra}	4 ^{ta}	5 ^{ta}	6 ^{ta}	7 ^{ma}	8 ^{va}	Inoculaciones
0	7	14	21	28	35	42	56	Días
I ^{ro}					Final - Desangramientos			

FIGURA 1. Esquema de inmunización y desangramientos.

Detección serológica de Ac precipitantes

La relación antigénica existente entre los distintos aislamientos se estudió mediante la técnica de la contrainmunolectroforesis (CIE) (Grant, 1978) en placas de agarosa (Koch-light Laboratories Ltd.) al 0,75 % en tampón tris barbitúrico pH 8,6; y mediante la técnica de doble difusión en dos dimensiones (Ouchterlony y Nilsson, 1978) en placas de ion agar purificado (Difco Lab.) al 1,25 % en solución de NaHCO_3 al 0,004 M, las cuales se dejaron difundir a 4°C durante 48 horas en cámara húmeda.

Cada una de las pruebas se repitió cinco veces con un control negativo en todos los casos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al analizar el efecto principal del factor temperatura se observa que al comparar T1 y T2, esta última produce un efecto superior sobre el crecimiento micelial en todos los casos, habiéndose obtenido entre ambas temperaturas, diferencias altamente significativas (Tabla 2).

TABLA 2 Comparación de medias del crecimiento micelial lineal con las dos temperaturas ensayadas durante los cuatro días de evaluación,

Días de evaluación	$\bar{X}$	
	T1	T2
0	0,40	0,40
1	0,50	1,01
2	1,33	6,37
3	2,13	6,73
/ 4	3,16	7,63

Analizando el factor individual "aislamiento" se observa que CI y CIII no difieren entre sí, y a su vez éstos tienen un comportamiento superior en cuanto a crecimiento micelial lineal, con respecto al resto, siendo P, el aislamiento de crecimiento más lento (Tabla 3).

TABLA 3. Comparación de medias del crecimiento micelial lineal de los cuatro aislamientos considerados.

Aislamientos	CI	CII	P
$\bar{X}$	6,21	4,68	4,42
CIII	6,27	(ⁱⁱ)	(ⁱⁱⁱ)
CI	6,21	(ⁱⁱ)	(ⁱⁱⁱ)
CII	4,68		-

ES_r = 0,197 5

(ⁱⁱ) Diferencia significativa al P < 0,01

- Diferencia no significativa

La Tabla 4 nos muestra el efecto individual de los cuatro medios sintéticos ensayados. Los medios malta y PDA resultaron ser los más estimulantes para el crecimiento micelial, sin que se encontraran diferencias significativas entre ellos. El medio menos favorable fue Sabouraud, el cual difiere significativamente del resto.

TABLA 4. Comparación de medias del crecimiento micelial lineal con los cuatro medios de cultivo ensayados.

Medios		M2	M3	M4
	$\bar{x}$	6,52	6,00	2,28
M1	6,78	-	(ⁱⁱ)	(ⁱⁱ)
M2	6,52		-	(ⁱⁱ)
M3	6,00			(ⁱⁱ)
ES _x	0,1975			

(ⁱⁱ) Diferencia significativa al $P < 0,01$

- Diferencia no significativa

En la interacción temperatura-aislamiento, se evidencia que $28 \pm 22^\circ\text{C}$ es la temperatura favorable para el crecimiento de todos los aislamientos (Tabla 5).

Al considerar la interacción temperatura-medio, se observa que el efecto positivo del factor temperatura correspondiente a T2, se enmascara al combinarse con el medio Sabouraud, resultando en este caso las combinaciones T1M2 y T1M1 superiores (Tabla 6).

En la interacción aislamiento-medio el mejor comportamiento se obtuvo con la combinación C1M1, resultando además el aislamiento P, altamente estimulado con M2 y ligeramente favorecido con M1. También es de señalar que el efecto de C1 se enmascara al combinarse con M4. En general, las combinaciones de los medios malta, PDA y Czapek con los aislamientos C1 y CIII, resultan ser las mejores (Tabla 7, Figura 2).

Según la literatura consultada (Marks y Minke, 1969; Chou 1976); aislamientos de D. pinea tienen un crecimiento favorable en PDA y malta agar 3 %, respectivamente.

TABLA 5. Comparación de medias del crecimiento micelial lineal obtenidas en la interacción temperatura-aislamiento ($P \leq 0,05$).

Tratamientos	Medias
T2 CIII	9,11
T2 CI	8,13
T2 CII	6,94
T2 P	6,34
T1 CI	4,29
T1 CIII	3,44
T1 P	2,51
T1 CII	2,41
$ES_x = 0,279$	

TABLA 6. Comparación de medias del crecimiento micelial lineal obtenidas en la interacción temperatura-medio ($P \leq 0,05$).

Tratamientos	Medias
T2 M1	9,57
T2 M3	8,88
T2 M2	8,84
T1 M2	4,59
T1 M1	3,99
T2 M4	3,62
T1 M3	3,13
T1 M4	0,94
$ES_x = 0,279$	

TABLA 7. Comparación de medias del crecimiento micelial lineal obtenidas en la interacción aislamiento-medio ($P < 0,05$).

Tratamientos		Medias
CI	M1	7,95
P	M2	7,89
CI	M3	7,69
CI	M2	7,54
CIII	M2	7,33
CIII	M1	7,09
CIII	M3	7,05
CII	M1	6,45
CII	M3	5,76
P	M1	5,64
CIII	M4	3,63
P	M3	3,51
CII	M2	3,31
CII	M4	3,18
CI	M4	1,66
P	M4	0,65
$ES_{\bar{x}} = 0,3947$		

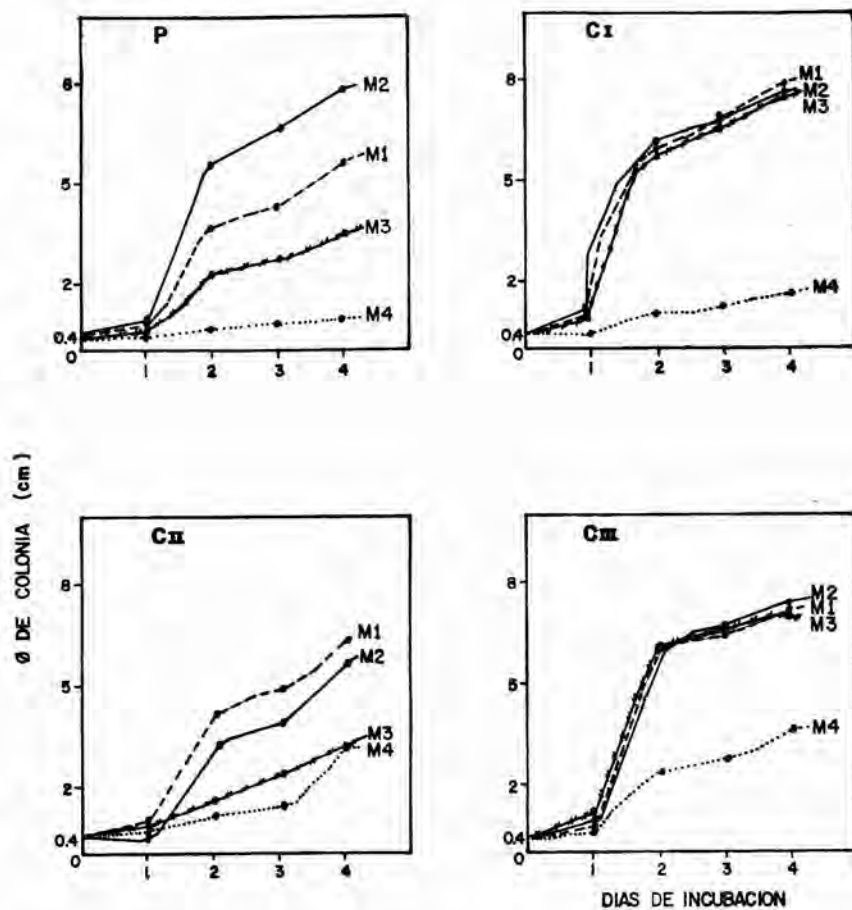


FIGURA 2. Curvas de crecimiento en cuatro medios de cultivo sintéticos de cuatro aislamientos de D. natalensis y D. pinea.

Malta (M1) PDA (M2) Czapek (M3) Sabouraud (M4)

Por otra parte, Davis (1980) señala como medio adecuado para el crecimiento de *D. natalensis* el agar jugo de vegetales, mientras que Fernández (1983) sugiere como medio sintético más favorable a PDA para temperaturas entre $28 \pm 29^{\circ}\text{C}$ y $30 \pm 29^{\circ}\text{C}$.

Como se puede observar, nuestros resultados concuerdan con lo planteado por Marks y Minke (1969) para *D. pinea* y con Fernández (1983) para el caso de *D. natalensis*.

Al analizar la significación entre tratamientos, puede ser atribuible la diferencia significativa al efecto de cualquiera de los tres factores considerados (temperatura, aislamiento, medio), pues de forma independiente los tres presentan diferencias altamente significativas, observándose además que los tres efectos principales no son independientes, sino dependientes, pues las interacciones dobles dan diferencias altamente significativas.

En cuanto a la interacción de los tres factores, podemos señalar que los mejores tratamientos son **C1** y **CIII** a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, en los medios malta, PDA y Czapek, los cuales no difieren entre sí. También es notable el aumento en el crecimiento del aislamiento P en medio PDA y a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Además, es de destacar la influencia negativa que tiene la combinación medio Sabouraud con T1, pues prácticamente iguala el comportamiento de uno de los mejores aislamientos (C1) con el aislamiento de peor crecimiento (P).

Los caracteres fenológicos de los aislamientos ensayados después de cuatro días de cultivo a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, se muestran en la Tabla 8. Podemos observar que en cada uno de los casos hay diferencias en el comportamiento sobre los medios M1 y M4, siendo el desarrollo del hongo menos vigoroso en **M4**, lo cual concuerda con los resultados estadísticos del crecimiento micelial.

Además, observamos que entre los aislamientos C1 y CIII hay mayor similitud fenológica que con el resto, siendo P el que más difiere por ser el menos vigoroso.

Con la técnica de la CIE podemos observar en la Figura 3 los arcos de precipitación obtenidos en los enfrentamientos homólogos y heterólogos de Ag y Ac; se destaca un mayor número de bandas intensamente coloreadas en las reacciones homólogas. El suero anti C1 no reconoce al antígeno P, y a su vez el antisuero P reconoce los tres aislamientos de *D. natalensis*, con un número de bandas de precipitación menor que el de la reacción homóloga. Además, debe destacarse que la reacción de los **Ag** de *D. natalensis* con el suero anti *D. pinea* es una reacción débil. También debe señalarse que la reacción del suero anti **C1** con los antígenos CII y **CIII** es moderada, al compararla con la reacción homóloga.

TABLA 8. Caracteres fenológicos de los aislamientos ensayados después de cuatro días de cultivo a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Aislamientos		Caracteres del micelio			
		Estructura	Color de la colonia		Presencia de fructificación
CI	M1	Algodonoso.	Gris oscuro	Gris claro	Abundante en el centro
	M4	"	"	"	Ninguna
CII	M1	"	"	"	Escasez en el centro
	M4	"	"	"	Ninguna
CIII	M1	Poco algo-donoso	Gris	"	Muy escasa
	M4	"	"	Gris	Ninguna
P	M1	Fibroso	Gris claro	Blanco	"
	M4	"	Gris	Amari-llento	"

Ag \ As	P	C _I
P	 (5)	
C _I	 (2)	 (6-7)
C _{II}	 (3)	 (4)
C _{III}	 (3)	 (3-4)

FIGURA 3. Diagrama representativo de la intensidad y el número de líneas de precipitación observadas en la prueba de la CIE al enfrentar los Ag, - As homólogos y heterólogos de aislamientos de D. natalensis y D. pitea. Los bloques indican la intensidad de la reacción de precipitación.

-  No reacción
-  Reacción débil
-  Reacción moderada
-  Reacción fuerte

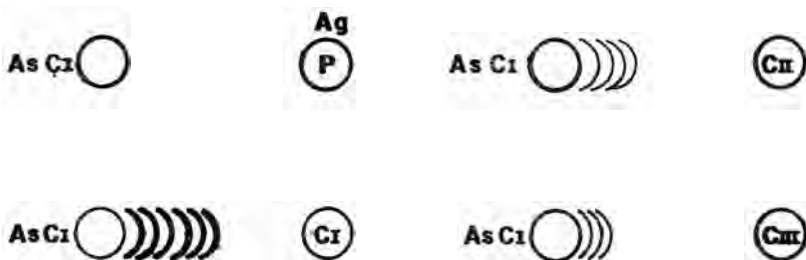


FIGURA 4 Técnica de la contra inmunolectroforesis (CIE).

La Figura 4 muestra la técnica de la CIE con el antisuero C1 enfrentado a los cuatro **Ag** preparados.

Los resultados obtenidos con la técnica de la doble difusión en dos dimensiones (Ouchterlony) se resumen en la Figura 5, donde se muestra la disposición de los arcos de precipitación bajo las condiciones experimentales. El antisuero P reconoce una banda tenue en el Ag CII. Se reconocen tres determinantes antigénicos comunes en los tres aislamientos de *D. natalensis*, y se observan diferentes intensidades en estas reacciones.

Ag \ As	P	CI	CII	CIII
P				
CI				

FIGURA 5 Esquema de la disposición de los arcos de precipitación obtenidos por la prueba de la doble difusión en dos dimensiones (Ouchterlony y Nilsson, 1978) al enfrentar As - **Ag** homólogos y heterólogos de aislamientos de *D. natalensis* y *D. pinea*.

Con esta prueba tampoco el suero anti D. natalensis reconoce al antígeno de D. pinea.

Un ejemplo de los arcos de precipitación obtenidos con la técnica de la doble difusión en dos dimensiones (Ouchterlony), se muestra en la Figura 6, donde se enfrenta antisuero CI con los cuatro aislamientos considerados.

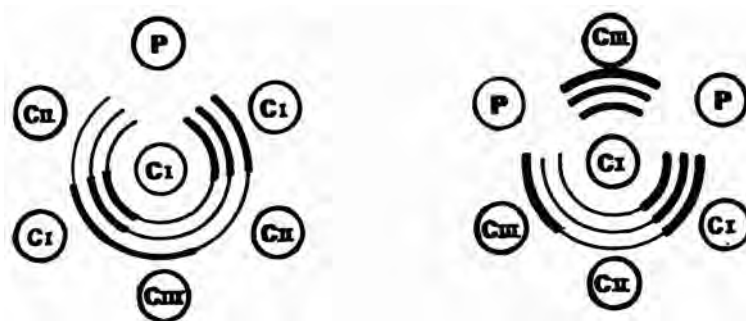


FIGURA 6. Inmunodifusión doble en dos dimensiones (Ouchterlony); en el pocillo central los As y en la periferia los Ag.

Mediante las dos técnicas serológicas utilizadas, podemos diferenciar serológicamente especies de un mismo género, basándonos en el alto número de bandas y la intensidad de las mismas en reacciones homólogas, lo cual concuerda con los resultados de Amos y Burrell (1967), Morton y Dukes (1966), Dorworth y Krywienczyk (1975), Dorworth et al. (1977), Olivier (1979), Krywienczyk y Dorworth (1980).

El suero anti D. natalensis no reconoce al aislamiento de D. pinea, lo que aporta un elemento más de gran importancia en la utilización de estas dos pruebas para el diagnóstico en Micología. El aislamiento de D. pinea sólo es reconocido por su antisuero homólogo. Por otra parte, el antisuero **P** reconoce parcialmente los aislamientos de D. natalensis, siendo en la CIE el número de bandas pequeño y de reacción débil y en la inmunodifusión doble sólo se detecta una débil banda con CII, por lo que esta prueba puede ser utilizada como un método rápido, sensible y eficaz de diferenciación de especies de un mismo género. Además mediante la CIE y la inmunodifusión doble en dos dimensiones, se establecen relaciones de antigenicidad entre los aislamientos de D. natalensis a partir de Cedrela odorata procedente de distintas localidades y de éstos con el aislamiento de D. pinea. Observamos que el comportamiento de CI

difiere de CII y CIII, y a su vez entre todos los aislamientos de *D. natalensis* existen antígenos comunes, por lo que se sugiere la utilización de antisueros monoespecíficos para obtener una mejor resolución en la diferenciación serológica.

CONCLUSIONES

- La temperatura de $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ es favorable para el crecimiento micelial de las dos especies estudiadas.
- Se evidencia que los medios malta y PDA son adecuados para el desarrollo micelial de *D. natalensis* Pole Evansy *D. pinea* (Desm.) Kickx, Fl. Flandres.
- Se obtuvieron sueros hiperinmunes contra *D. natalensis* y *D. pinea* procedentes de *C. odorata* L y *P. tropicalis* Morelet, respectivamente.
- El aislamiento de *D. pinea* difiere de los de *D. natalensis* en cuanto a crecimiento micelial, características fenológicas y características serológicas.

RECOMENDACIONES

- Se sugiere la utilización de las técnicas CIE y la inmunodifusión doble en dos dimensiones, como un método de diagnóstico rápido y eficaz en la diferenciación de especies dentro de un mismo género.
- Se recomienda el empleo de estas dos técnicas para la diferenciación de aislamientos en la misma especie.

ABSTRACT

COMPARISONS AMONG *Diplodia* SPP. ISOLATES FROM FOREST HOSTS BY TRADITIONAL AND IMMUNOLOGICAL METHODS

The objective of the present paper is the study of the behaviour of the isolates of *Diplodia natalensis* Pole Evans and *Diplodia pinea* (Desm.) Kickx, Fl. Flandres of different

origins in four cultures and two temperatures as a traditional methods; in addition immunological relations were established among them. It was determined that there exist differences amongst the isolates, which has great importance in the development of the diagnosis and control of the forest disease.

BIBLIOGRAFIA

- AMOS, R.E. and R. G. BURRELL. 1967. Serological differentiation in Ceratocystis. Phytopathology 57: 32-34.
- CHOU, C. K. S. 1976. A-shoot dieback in P. radiata caused by D. pinea. I. Symptoms, disease development and isolation of pathogen. N. Z. J. For. Sci. 6 (1): 72-79.
- DAVIS, R.M. 1980. Twig dieback of Star Ruby Grapefruit, J. Rio Grande Valley Hort. Soc. 34: 115-119.
- DORWORTH, C. E. 1973. Comparison of soluble proteins of Ascochyta blight and Gremmeniella abietina by serology and electrophoresis. Can. J. Bot. 52: 919-923.
- DORWORTH, C. E. and J. KRYWIENCZYK. 1975. Comparisons among isolates of Gremmeniella abietina by means of growth rate, conidia measurement, and immunogenic reaction. Can. J. Bot. 53 (21): 2506-2525.
- DORWORTH, C. E. et al. 1977. New York isolates of G. abietina identical in immunogenic reaction to European isolates Plant Dis. Rep. 61: 887-890.
- DORWORTH, C. E. et al. 1982. Comparisons between serological and gas chromatographic techniques for characterization of G. abietina and related species. European J. For. Pathol. 12: 209-217.
- DOUBLY, J.A. et al. 1960. Relation of antigens of Melampsora lini and Linum usitatissimum to resistance and susceptibility. Science 131: 227.

- DUNCAN, D. R. 1965. Multiple range F. Test. Biometrics 11:1-42.
- FERNANDEZ, A. I. 1983. Comunicación personal.
- GRANT, J. 1978. Handbook of experimental immunology. 3. ed. London, Blackwell Scientific Publications. p. 39
- KRYWIENCZYK, J. and C.E. DORWORTH. 1980. Serological relationships of some fungi of the genus Pythium. Can. J. Bot. 58: 1412-1417.
- LIESE, A. L. and A. R. GOTLIEB. 1982. Utilization of the ELISA technique for the diagnosis of two fungal diseases: Sclerotinia canker of conifers and downy mildew of sunflower. Phytopathology 72 (2): 263.
- MARKS, G. C. and G. MINKE. 1969. The pathogenicity of D. pinea to Pinus radiata D. Don. Aust. J. Bot. 17: 1-12.
- MORTON, D.J. and P.D. DUKES. 1966. Serological differentiation of race 1 from race 2 of Fusarium oxysporum F. sp. Lycopersic. Plant Dis. Rep. 50 (6): 444-445.
- NACHMIAS, A. et al. 1979. Diagnosis of mal secco disease in lemon by enzyme-linked immunosorbent assay. Phytopathology 69 (6): 559-561.
- OLIVIER, J.M. 1979.. Etude sérologique de quelques Botrytis. Phytopath. Z. 95:65-76.
- OUCHTERLONY, O. and P.A. NILSSON. 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En: Handbook of experimental immunology. 3. ed. London, Blackwell Scientific Publications. p. 655-706.
- PELAEZ, I. y A. I. FERNANDEZ. (En prensa.) Determinación de la variación de la concentración proteica en el tiempo con el hongo D. natalensis. Ciencia de la Agricultura.
- RARNA, B. E. BALAZ and Z. KIRALY. 1978. Common antigens and rust diseases. Phytopath. Z. 93: 336-341.

TEMPEL, A. 1959. Serologisch onderzoek bij Fusarium oxysporum.
Meded Landbouwhogeschool 59 (7): 1-60.

WENDLER, B.P., R.A. GOTLIEB and R.D. BERGDAHL. 1980. A newly
by discovered serotype of G. abietina. Can. J. Bot.
58 (17): 1923-1928.