

# DETECCIÓN DE *PHYTOPHTHORA* SPP. Y PATÓGENOS FÚNGICOS EN VIVEROS FORESTALES DE LA COMUNIDAD VALENCIANA

Paloma Abad-Campos, Alejandro Giménez Marco, Sebastiano Piazza, Maela León, José García-Jiménez y Ana M<sup>a</sup> Pérez-Sierra

Grupo de Investigación en Hongos Fitopatógenos. Instituto Agroforestal Mediterráneo. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n. 46022-VALENCIA (España). Correo electrónico: pabadcam@eaf.upv.es

## Resumen

Se ha realizado una prospección en siete viveros forestales de la Comunidad Valenciana muestreando plantas que presentaban síntomas de marchitez, clorosis, manchas foliares, coloración anormal de acículas, malformación de brotes, defoliación y/o enanismo. Se recogieron muestras vegetales y del sustrato en el que fueron cultivadas. Los aislamientos a partir del material vegetal se realizaron en los medios de cultivo CMA-PARPBH y PDAS. Se utilizaron manzanas como cebo vegetal para el aislamiento a partir de muestras de sustrato. Se obtuvieron cultivos puros de los hongos y oomicetos aislados; dichos cultivos se identificaron inicialmente a nivel morfológico. La identificación molecular de los aislados de oomicetos y *Rhizoctonia* se basó en la amplificación y secuenciación de la región ITS del ADNr. Los aislados de *Cylindrocarpon* se identificaron mediante PCR con cebadores específicos. De raíces con síntomas de podredumbre y/o sustrato se aisló *Phytophthora cactorum*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. nicotianae*, *P. plurivora* y diversos aislados de *Pythium*. Los hongos aislados con mayor frecuencia fueron *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *Fusarium* sp., *Cylindrocarpon macrodidymum*, *C. liriodendri*, *Cylindrocarpon* sp. y *Rhizoctonia* sp.

Palabras clave: Diagnóstico, Reforestación, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*

## Abstract

A survey was conducted in seven forest nurseries in the Comunidad Valenciana region. Plants showing dieback, wilting, chlorosis, leaf spots, discoloration of needles, aborted buds, defoliation and / or stunting symptoms were sampled. Affected plant material and soil samples were collected. Isolation from plant material was performed onto CMA-PARPBH and PDAS culture media. Apples were used as bait for soil isolations. Pure cultures of fungi and oomycetes were obtained and initially morphologically identified. Molecular identification of *Rhizoctonia* and oomycetes isolates was based on the amplification and sequencing of the ITS region of its rDNA. *Cylindrocarpon* isolates were identified by PCR using specific primers. The oomycetes *Phytophthora cactorum*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. nicotianae*, *P. plurivora* and several isolates of *Pythium* were isolated from affected roots and soil. The most frequently isolated fungi were *Cylindrocarpon liriodendri*, *C. macrodidymum*, *Cylindrocarpon* sp., *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *Fusarium* sp. and *Rhizoctonia* sp.

Keywords: diagnosis, reforestation, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*

## INTRODUCCIÓN

En los viveros forestales de la Comunidad Valenciana, la producción de planta está dirigida principalmente a la repoblación forestal. Los brinzales deben poseer una calidad adecuada que avale su supervivencia y arraigo en un medio natural, la mayoría de veces hostil, especialmente en la zona mediterránea, y así contribuir al éxito de la repoblación forestal (RUANO, 2002). La exigencia de calidad debería incluir el estado fitosanitario de los brinzales, ya que el material vegetal ya infectado en los viveros puede ser una importante vía de dispersión de patógenos (BRASIER, 2008). En España, la información sobre este tema es escasa y, concretamente, se carece de datos sobre la incidencia de hongos y oomicetos fitopatógenos en viveros forestales de la Comunidad Valenciana. MARTIN PINTO et al. (2004, 2006, 2007) estudiaron la influencia del lugar y la estación sobre la comunidad fúngica presente en hojas y tallos de plantas y la frecuencia de aislamiento de hongos fitopatógenos en *Pinus* y *Quercus* en viveros forestales de Castilla-León. Posteriormente, los mismos autores señalaron que *Fusarium verticillioides* podía ser responsable de pérdidas significativas debidas a *damping-off*, aunque tradicionalmente *F. oxysporum* había sido considerado el principal agente responsable de esta enfermedad en los viveros forestales españoles. En las prospecciones realizadas en viveros forestales de Andalucía, se detectó que el pino carrasco (*Pinus halepensis*) presentaba un síndrome de podredumbre radical recurrente, causado por *Phytophthora drechsleri* (SÁNCHEZ et al., 2002a). En *Quercus* spp., las plántulas de encina, alcornoque, quejigo y coscoja presentaban, en ocasiones, infección de raicillas absorbentes producida por dos grupos de patógenos bien distintos: *Phytophthora* y *Cylindrocarpon* (SÁNCHEZ et al., 2002b, 2005; ANDICOBERRY et al., 2008). También se aisló *Pythium irregulare* y *F. oxysporum* consistentemente de raicillas necróticas de plántulas de algarrobo (*Ceratonia siliqua*) (SÁNCHEZ et al., 2010). Este trabajo presenta los resultados iniciales de una prospección en los viveros forestales de la Comunidad Valenciana, con el fin de estimar el estado sanitario del material producido.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Desde noviembre de 2009 hasta marzo de 2011 se visitaron siete viveros forestales de propiedad pública en distintos periodos del año. Tras una observación general del vivero, de cada especie vegetal cultivada se recogieron plantas que presentaran síntomas de enfermedad así como sus sustratos. Adicionalmente, en uno de los viveros se realizó un muestreo aleatorio del 10% de las plantas (asintomáticas y con síntomas) en dos eras, en las que se cultivaba *P. pinaster* de 2 savias y *Quercus ilex* de 1 savia.

Se utilizaron los medios de cultivo PARPBH-CMA (JEFFERS & MARTÍN, 1986) y PDAS (patata-dextrosa-agar suplementado con 0,5 g·l<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomicina) para el aislamiento de oomicetos y hongos, respectivamente, a partir de pequeños fragmentos de tejido afectado, siendo raíces la mayoría de las muestras procesadas. Las placas se incubaron a 25°C en oscuridad durante 3 a 7 días. Los aislados se transfirieron a medio PDA para obtener cultivos puros e iniciar su identificación morfológica. Para el aislamiento de oomicetos a partir de muestras de sustrato se utilizaron manzanas var. Granny Smith como cebo vegetal (ERWIN & RIBEIRO, 1996). La caracterización de los aislados de *Phytophthora* se basó en la morfología de la colonia y en la producción, morfología y dimensiones de los esporangios, oogonios y anteridios (ERWIN & RIBEIRO, 1996). La formación de esporangios se indujo cultivando los aislados en medio V8-agar a 25°C en oscuridad y depositando después discos de micelio de estas colonias en solución estéril de extracto de suelo. Los aislados de *Phytophthora* que no formaron gametangios se sembraron en medio CPA (agar con zanahoria rallada) en presencia de aislados de referencia de los tipos de apareamiento A1 y A2 de *P. cryptogea*, proporcionados por Sabine Werres (Julius Kühn-Institute, Braunschweig, Alemania).

Las características de las colonias y la morfología de las esporas obtenidas en medio PDA a 25°C en oscuridad fueron los criterios iniciales para la identificación de los hongos aislados. Las especies de *Fusarium* se identificaron induciendo su esporulación en medio SNA (Spezieller Nährstoffarmer Agar), incubando las placas a 25°C durante 10 días.

La identificación molecular de los oomicetos se basó en la secuenciación de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosómico, amplificada mediante PCR con los cebadores ITS4 e ITS6 (WHITE et al., 1990; COOKE et al., 2000). Para ello, el ADN de los aislados se extrajo previamente de acuerdo con las instrucciones del EZNA Plant Miniprep Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA). También se realizó un análisis de la secuencia de la región ITS del ADNr de aislados de *Rhizoctonia*. La identificación molecular de los aislados de *Cylindrocarpon* se realizó mediante PCR multiplex, utilizando los cebadores diseñados por ALANIZ et al. (2009) que permiten detectar *C. liriodendri*, *C. macrodidymum* y *C. pauciseptatum* en una única reacción.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se procesaron un total de 297 muestras vegetales; de ellas, 166 presentaban síntomas de enfermedad y las restantes procedían del muestreo aleatorio realizado en uno de los viveros. Las muestras vegetales procesadas se distribuían en 19 géneros y 30 especies botánicas, perteneciendo la mayoría de ellas a los géneros *Pinus* (48,8%) y *Quercus* (35,7%). Se encontró una gran diversidad de síntomas aéreos que incluían marchitez, bien del total de la planta o de alguna de sus partes, amarillez, manchas foliares, coloración rojiza de acículas, malformación de brotes, defoliación y/o retraso del crecimiento. Los síntomas observados en el sistema radical de los brinzales fueron reducción del mismo, necrosis más o menos extensa de raíces y/o podredumbre de raicillas absorbentes.

Se aislaron oomicetos y hongos fitopatógenos, procedentes de 20 especies vegetales (Tabla 1), coexistiendo varios de estos microorganismos en nueve de los hospedantes, incluso, en algunos casos en una misma planta. En todos los viveros prospectados se ha detectado la presencia de, al menos, una especie de *Phytophthora* asociada a la rizosfera de brinzales. *Phytophthora* spp. se aislaron en el 10,8% de las plantas recogidas, bien de sus raíces o del sustrato contenido en el alveolo correspondiente. Las especies identificadas de *Phytophthora*, ordenadas de acuerdo con su por-

centaje de aislamiento, fueron *P. cryptogea* (34%), *P. plurivora* (24,5%), *P. nicotianae* (19,5%), *P. cactorum* (13,5%) y *P. citrophthora* (8,5%).

Los hongos aislados con mayor frecuencia pertenecían a los géneros *Fusarium*, *Cylindrocarpon* y *Rhizoctonia*. Del sistema radical de 153 plantas (51,5% de las plantas analizadas) se aisló *Cylindrocarpon*. Mediante PCR múltiple con cebadores específicos, se determinó que el 72,7% de los aislados pertenecían a la especie *C. macrodidymum*, 2,9% eran *C. liriodendri* y el resto no dieron producto de amplificación, siendo considerados *Cylindrocarpon* sp. No se detectó la presencia de *C. pauciseptatum* en ningún vivero.

Se aislaron hongos del género *Fusarium* de las raíces de 94 plantas (31,7% de las plantas analizadas). La identificación de estos aislados se basó únicamente en caracteres fenotípicos, considerándose el 54% de los aislados *F. oxysporum*, 22% *F. proliferatum*, 19% *Fusarium* sp., 4% *F. solani* y 2% *F. verticillioides*. No se detectó en ningún vivero *Fusarium circinatum* ni se realizaron bioensayos para valorar la patogenicidad de los Fusaria. Se aislaron basidiomicetos con características propias de *Rhizoctonia* del sistema radical del 13,5% de las plantas. La amplificación y secuenciación de las regiones ITS del ADNr de estos aislados no permitió su identificación a nivel de especie, ya que la búsqueda en el GenBank reconoció estas secuencias como *Rhizoctonia* sp., *Ceratobasidium* sp. u hongo desconocido.

En el muestreo aleatorio de una era con *P. pinaster* de 2 savias se aisló uno o más de los géneros *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon* y *Rhizoctonia* en 35 brinzales. En igual cantidad de plantas se aisló sólo *Cylindrocarpon*; en tres brinzales alguno de los géneros citados, a excepción de *Cylindrocarpon*, y en las nueve restantes no se obtuvo ningún aislado de estos cinco géneros. En el muestreo aleatorio de *Q. ilex*, los resultados fueron: en 13 plantas sólo se aisló *Cylindrocarpon*, en otras diez estaba presente tanto *Cylindrocarpon* como alguno de los otros géneros citados, en tres brinzales sólo se aisló *F. oxysporum* y en las nueve restantes no se obtuvo ningún aislado de estos cinco géneros. *C. macrodidymum* y *C. liriodendri* son patógenos asociados a la enfermedad del pie negro de la vid (ALANIZ et al., 2007). Previamente, *Neonectria* spp., teleomorfo de

Hospedante	M <sup>1</sup>	Oomicetos <sup>2</sup>	Hongos
<i>Arbutus unedo</i>	R	<i>P. cryptogea</i>	<i>C. macrodidymum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>Rhizoctonia</i> sp.
	S	<i>P. cryptogea</i>	
<i>Celtis australis</i>	R		<i>F. proliferatum</i>
<i>Ceratonia siliqua</i>	R		<i>F. oxysporum</i>
	S	<i>P. nicotianae</i>	
<i>Cistus albidus</i>	R	<i>P. cactorum</i> , <i>P. cryptogea</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>C. macrodidymum</i>
	S	<i>P. cactorum</i> , <i>P. cryptogea</i>	
<i>Crataegus monogina</i>	R		<i>C. macrodidymum</i> , <i>F. oxysporum</i>
<i>Cupressus sempervirens</i>	R		<i>C. macrodidymum</i>
<i>Fraxinus ornus</i>	R	<i>P. cryptogea</i> , <i>Pythium</i> sp.	<i>C. macrodidymum</i> , <i>F. proliferatum</i>
	S	<i>P. cryptogea</i>	
<i>Juniperus phoenicea</i>	R		<i>C. macrodidymum</i> , <i>Cylindrocarpon</i> sp.
<i>Pinus canariensis</i>	R		<i>F. oxysporum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp.
<i>Pinus halepensis</i>	R	<i>P. cactorum</i> , <i>P. cryptogea</i> , <i>P. nicotianae</i> , <i>Py. vexans</i>	<i>C. liriodendri</i> , <i>C. macrodidymum</i> , <i>Cylindrocarpon</i> sp., <i>F. oxysporum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp.
	S	<i>P. cryptogea</i> , <i>P. nicotianae</i> , <i>P. plurivora</i> , <i>Pythium</i> sp.	
<i>Pinus nigra</i>	H		<i>Sphaeropsis sapinea</i>
ssp. <i>salzmannii</i>	R	<i>P. plurivora</i> , <i>Pythium</i> sp.	<i>C. macrodidymum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Fusarium</i> sp.
<i>Pinus pinaster</i>	R	<i>P. cryptogea</i> , <i>P. plurivora</i>	<i>C. liriodendri</i> , <i>C. macrodidymum</i> , <i>Cylindrocarpon</i> sp., <i>F. oxysporum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp.
	S	<i>P. cryptogea</i> , <i>P. nicotianae</i> , <i>P. plurivora</i>	
<i>Pinus pinea</i>	R	<i>P. citrophthora</i>	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. solani</i>
<i>Pinus sylvestris</i>	R	<i>P. cryptogea</i> , <i>Py. litorale</i>	<i>F. oxysporum</i>
<i>Quercus coccifera</i>	R		<i>C. macrodidymum</i>
<i>Quercus faginea</i>	R		<i>C. macrodidymum</i> , <i>Cylindrocarpon</i> sp., <i>F. proliferatum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp.
<i>Quercus ilex</i> ssp. <i>ballota</i>	R	<i>P. cryptogea</i> , <i>P. plurivora</i> , <i>Py. helicoides</i> , <i>Py. litorale</i> , <i>Py. sterilum</i>	<i>C. macrodidymum</i> , <i>Cylindrocarpon</i> sp., <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Fusarium</i> sp.
	S	<i>P. cactorum</i> , <i>P. citrophthora</i> , <i>P. plurivora</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.
<i>Sorbus domestica</i>	S	<i>P. cryptogea</i>	
<i>Taxus baccata</i>	R		<i>Rhizoctonia</i> sp.
<i>Viburnum lantana</i>	R	<i>P. cactorum</i>	

**Tabla 1.** Oomicetos y hongos aislados de plantas y/o sustratos procedentes de diversos viveros forestales de la Comunidad Valenciana. <sup>1</sup>Tipo de muestra: R, raíces; S, sustrato; H, hojas. <sup>2</sup>P., *Phytophthora*; Py., *Pythium*

*Cylindrocarpon*, ya había sido citado como agente causal de muerte de raíces en viveros forestales en países escandinavos (BEYER et al., 1991; MENKIS et al., 2006).

La implicación de especies de *Phytophthora* en enfermedades de plantas cultivadas es bien conocida desde que, en 1876, Anton de Bary describió a *P. infestans* como el agente causal del

mildiu de la patata. Sin embargo, es en las dos últimas décadas cuando se constata la creciente detección de nuevas especies de *Phytophthora* en el ámbito forestal, la dificultad por parte de viveros y de autoridades fitosanitarias para detectar estas nuevas especies y el desconocimiento sobre su implicación en la salud y en la regeneración de los bosques (JUNG et al., 2007).

De las cinco especies de *Phytophthora* detectadas en los viveros prospectados, cabe destacar a *P. plurivora*, especie nueva que surge de una re-evaluación de aislados de *P. citricola*, originales de hospedantes leñosos en Europa y Norteamérica (JUNG & BURGESS, 2009). En nuestro trabajo hemos aislado a *P. plurivora* de raíces de *P. nigra* y *P. pinaster* y del sustrato contenido en los alveolos donde crecían brinzales de *P. halepensis*, *P. pinaster* y *Q. ilex*, especies leñosas no incluidas en el rango de hospedantes descrito por JUNG & BURGESS (2009).

Los resultados de este trabajo aportan datos acerca de la presencia de diversos organismos fitopatógenos en viveros forestales de la Comunidad Valenciana. Aunque no se ha cuantificado la incidencia de estas infecciones, sí cabe destacar que en todos los viveros, independientemente de la época del año en que se realizaron las visitas, se aisló alguna especie de *Phytophthora* y de hongos fitopatógenos. Los síntomas asociados a infecciones causadas por estos patógenos se pueden confundir con daños de origen abiótico, tales como frío, desequilibrios nutricionales o de riego. SÁNCHEZ et al. (2010), con amplia experiencia en la detección de enfermedades en viveros forestales andaluces, ofrecen una serie de recomendaciones que son aplicables para el control de estas afecciones. Los resultados de este trabajo proporcionan información preliminar que sirve de base para futuros estudios de la incidencia de estos patógenos en viveros forestales.

### Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a Eduardo Pérez-Laorga (Servicio de Prevención de Incendios y Sanidad Forestal de la Generalitat Valenciana) y al personal de los viveros por su ayuda. Financiación AGL2007-64690 (Ministerio de Educación y Ciencia, Fondos FEDER).

### BIBLIOGRAFÍA

ALANIZ, S.; LEON, M.; VICENT, A.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD-CAMPOS, P. & ARMENGOL, J.; 2007. Characterization of *Cylindrocarpon*

species associated with black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Dis.* 91: 1187-1193.

ALANIZ, S.; ARMENGOL, J.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ABAD-CAMPOS, P. & LEON, M.; 2009. A multiplex PCR system for the specific detection of *Cylindrocarpon liriodendri*, *C. macrodidymum*, and *C. pauciseptatum* from grapevine. *Plant Dis.* 93: 821-825.

ANDICOBERRY, S.; LORA, F.; SÁNCHEZ, M.E. Y TRAPERO, A.; 2008. *Podredumbre radical (colapso tardío) de Quercus spp. en vivero*. Servicio de Ordenación de los Recursos Forestales. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. Sevilla.

BEYER-ERICSON, L.; DAMM, E. & UNESTAM, T.; 1991. An overview of root dieback and its causes in Swedish forest nurseries. *Eur. J. For. Pathol.* 21: 439-443.

BRASIER, C.M.; 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathol.* 57: 792-808.

COOKE, D.E.L.; DRENTH, A.; DUNCAN, J.M.; WAGELS, G. & BRASIER, C.; 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genet. Biol.* 30 (1): 17-32.

ERWIN, D.C. & RIBEIRO, O.K.; 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A.

JEFFERS, S.N. & MARTIN, S.B.; 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.* 70: 1038-1043.

JUNG, T.; VANNINI, A. & BRASIER, C.M.; 2007. Progress in understanding *Phytophthora* disease of trees in Europe 2004-2007. *In: Proceedings of the Fourth Meeting of the IUFRO Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems: 3-25*. Monterey, California.

JUNG, T. & BURGESS, T.; 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia* 22: 95-110.

MARTÍN PINTO, P.; PAJARES, J.A.; NANOS, N. & DÍEZ, J.J.; 2004. Site and seasonal influences on the fungal community on leaves and stems of *Pinus* and *Quercus* seedlings in forest nurseries. *Sydowia* 56 (2): 23-37.

- MARTÍN PINTO, P.; PAJARES ALONSO, J.A.; PANDO FERNÁNDEZ, V. & DíEZ CASERO, J.J.; 2006. Fungi isolated from diseased nursery seedlings in Spain. *New Forests* 31: 41-56.
- MARTÍN PINTO, P.; PAJARES, J.A. & DíEZ, J.J.; 2007. Pathogenicity of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium oxysporum* on *Pinus nigra* seedlings in northwest Spain. *Forest Pathol.* 38: 7-82.
- MENKIS, A.; VASILIAUSKAS, R.; TAYLOR, A.F.S.; STENSTRÖM, E.; STENLID, J. & FINLAY, R.; 2006. Fungi in decayed roots of conifer seedlings from forest nurseries, afforested clearcuts and abandoned farmland. *Plant Pathol.* 55: 117-129.
- RUANO, J.R.; 2002. *Viveros forestales*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. 281 pp.
- SÁNCHEZ, M.E.; ANDICOBERRY, S. & TRAPERO, A.; 2002a. *Phytophthora* root rot of Aleppo pine seedlings in a forest nursery in Spain. *Plant Dis.* 86: 563.
- SÁNCHEZ, M.E.; LORA, F. & TRAPERO, A.; 2002b. First report of *Cylindrocarpon destructans* as a root rot pathogen of Mediterranean *Quercus* species in Spain. *Plant Dis.* 86: 693.
- SÁNCHEZ, M.E.; ANDICOBERRY, S. & TRAPERO, A.; 2005. Pathogenicity of three *Phytophthora* spp. causing late seedling rot of *Quercus ilex* spp. ballota. *Forest Pathol.* 35: 115-125.
- SÁNCHEZ, M.E.; ROMERO, M.A.; VARO, R.; ANDICOBERRY, S.; LORA, F. Y TRAPERO, A.; 2010. Principales enfermedades detectadas en viveros forestales de Andalucía. *Vida RURAL* (15/Junio/2010): 39-43.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J.W.; 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (eds.), *PCR protocols, a Guide to Methods and Applications*: 482. Academic Press, San Diego, California.