

FITOPATOGENE GLJIVE UZROČNICI SUŠENJA MASLINE (*Olea europaea* L.) NA PODRUČJU ISTRE

Sara GODENA¹, Dario IVIĆ², Ivana DMINIĆ ROJNIĆ³, Bernardina HLEVNIJAK PASTROVICCHIO⁴

¹Zavod za poljoprivredu i prehranu, Institut za poljoprivredu i turizam, Karla Huguesa 8, 52 440 Poreč

²Zavod za zaštitu bilja, Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Gorice 68 b, 10 000 Zagreb

³Poljoprivredni odjel u Poreču, Veleučilište u Rijeci, Karla Huguesa 6, 52 440 Poreč

⁴Udruga Agroturist Vodnjan, Trg slobode 2, 52 215 Vodnjan
sara@iptpo.hr

Prihvaćeno: 2017-11-23

Istraživanje pojave sušenja stabala maslina u Istri provedeno je tijekom 2016. i 2017. godine. Zbog određivanja uzročnika koji bi mogli biti odgovorni za navedenu pojavu obavljeni su vizualni pregledi stabala i uzorkovanje biljnoga materijala. Uzorci biljnog materijala prikupljeni su na 23 lokacije unutar četiri maslinarska uzgojna područja: bujsko-umaškom, porečko-vrsarskom, rovinjskom i vodnjansko-pulskom. Navedena uzgojna područja razlikovala su se po mikroklimatskim obilježjima, sortimentu, starosti stabala te svojstvima tla. Identifikacija pojedinih uzročnika bolesti obavljena je u specijaliziranom mikološkom laboratoriju. U simptomatičnim uzorcima ustanovljeno je nekoliko vrsta, rodova i porodica fitopatogenih gljiva. Za identifikaciju vrsta korištene su klasične (uzgoj na hranjivim podlogama i analiza morfologije izolata) i molekularne (PCR i sekvenciranje) metode dijagnostike. Ukupno je sakupljeno 78 izolata. Najčešće izolirana vrsta fitopatogene gljive, a koja bi mogla biti uzročnik djelomičnog ili potpunog sušenja, slabijeg rasta i slabijeg vigora maslina, bila je vrsta *Verticillium dahliae* Kleb. Osim te u simptomatičnim uzorcima ustanovljene su i *Diplodia seriata*, gljiva iz porodice Botryosphaeriaceae, te *Armillaria mellea*, uzročnik bijele truleži korijena. Prisutnost vrste *V. dahliae* (na 57 % lokacija) i *A. mellea* (na 17 %) potvrđena je u svim maslinarskim uzgojnim područjima obuhvaćenim ovim istraživanjem, dok je prisutnost vrste *D. seriata* (na 13 % lokacija) ustanovljena samo u maslinicima u okolini Rovinja i Bala.

Ključne riječi: *Armillaria mellea*, Botryosphaeriaceae, *Diplodia seriata*, maslina, *Verticillium dahliae*

PHYTOPATHOGENIC FUNGI CAUSATIVE AGENTS OF OLIVE (*Olea europaea L.*) DECLINE IN THE AREA OF ISTRIA

SUMMARY

The appearance of decline of olive trees in Istria during the years 2016 and 2017 was investigated. To determine the possible causative agents that could be related to that phenomenon, visual examinations of trees and collection of samples of plant material were carried out. Samples of plant material were collected on 23 locations, within four olive growing areas: Buje-Umag, Poreč-Vrsar, Rovinj and Vodnjan-Pula. Surveyes olive growing areas differed by microclimatic features, varieties, age of trees and soil properties. Identification of particular causative agents of diseases was performed in a specialized mycological laboratory. Several species, genera and families of phytopathogenic fungi has been identified in symptomatic samples. For the identification of species, classical (cultivation and analysis of isolate morphology) and molecular methods (PCR and sequencing) has been used. A total of 78 isolates were collected. The most common isolated species of phytopathogenic fungi, which could be the causative agent of partial or total decline, weaker growth and lower vigor of olives was the species *Verticillium dahliae* Kleb. Beside that, in symptomatic samples, *Diplodia seriata*, fungal species of the family Botryosphaeriaceae and *Armillaria mellea*, the causative agent of white root rot, were found. The oresence of *Verticillium dahliae* (on 57% of locations) and *Armillaria mellea* (on 17%) have been determined in all olive growing areas covered by this work, while the presence of *D. seriata* (on 13% of locations) have been determined only in olive groves in the area of Rovinj and Bale.

Key words: *Armillaria mellea*, Botryosphaeriaceae, *Diplodia seriata*, olive, *Verticillium dahliae*

UVOD

Maslinarstvo predstavlja važnu gospodarsku granu u poljoprivredi Republike Hrvatske. Prema podatcima Državnog zavoda za statistiku (2016) u 2015. godini ukupna površina pod maslinama u Hrvatskoj iznosila je 19 100 ha. Istra je hrvatska najsjevernija podregija uzgoja maslina na kojoj se prostire oko 4 400 ha maslinika. Prema nekim podatcima danas u Istri ima više od milijun stabala maslina, što čini oko 20 % ukupnog broja stabala maslina u cijeloj zemlji (Gašparec-Skočić i Milat, 2011).

S obzirom na gospodarsku važnost masline kao poljoprivredne kulture u Hrvatskoj, bitno je istaknuti da su uzročnici bolesti maslina do sada vrlo malo istraživani. U Istri je tijekom posljednjih nekoliko godina zabilježen sve veći broj slučajeva djelomičnog ili potpunog sušenja stabala maslina, no uzrok ove pojave nije sustavno istraživan. Uzrok sušenja stabala maslina može biti

parazitske prirode, a mogu ga uzrokovati fitopatogene gljive i bakterije. Bolesti koje se danas u svijetu opisuju kao najvažnije bolesti masline, u Hrvatskoj ili su slabo poznate ili zbog njihove pojave, do sada, nisu zabilježene veće štete. Primjeri za to su verticilijsko venuće čiji je uzročnik gljiva *Verticillium dahliae*, antraknoza koju uzrokuju *Colletotrichum* spp. te gljivični rak uzrokovan vrstama iz porodice *Botryosphaeriaceae*. Zbog negativnog djelovanja klimatskih promjena, intenzivne trgovine biljnim materijalom te promjena tehnologije uzgoja s vremenom se sve više javljaju, razvijaju i šire novi uzročnici bolesti masline u Hrvatskoj poput nedavno ustanovljenih gljiva *Phoma incompta* (Ivić i sur., 2010) i *Diplodia seriata* (Kaliterna i sur., 2012). U posljednje vrijeme Hrvatskoj prijeti i pojava karantenske bakterije *Xylella fastidiosa* koja je devastirala maslinike u susjednoj Apuliji (Italija). Poznato je da je u svijetu vrlo čest uzročnik sušenja maslina gljiva *Verticillium dahliae* (López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011; García-Ruiz i sur., 2015; Bjeliš, 2009). Bolest koju uzrokuje navedena gljiva postala je, tijekom posljednja dva desetljeća, glavna prijetnja uzgoju u područjima u kojima se već tradicionalno, dugi niz godina, uzboga maslina. Štete koje uzrokuje *V. dahliae* ogledaju se u smanjenju uroda kod starijih stabala, dok kod mlađih stabala može doći i do potpunog venuća. Osim bakterije *X. fastidiosa* i gljive *V. dahliae*, sušenje maslina mogu izazvati i fitopatogene gljive koje napadaju korijen poput vrste *Armillaria mellea* (Loreto i sur., 1993; Singleton i sur., 1992) ili pseudogljiva iz roda *Phytophthora*. Prepostavlja se da bi uvođenje intenzivnog navodnjavanja u nasade maslina moglo rezultirati porastom broja bolesti korijena uzrokovanih navedenim patogenima. Osim navedenih, u posljednjih desetak godina intenzivno se istražuju i gljive iz porodice *Botryosphaeriaceae* (Úrbez-Torres i sur., 2013; Moral i sur., 2010; Kaliterna i Miličević, 2012). Tako je u svijetu do danas ustanovljen veći broj vrsta rodova *Diplodia*, *Neofusicoccum* ili *Botryosphaeria*, koje su potvrđene kao patogeni masline (Moral i sur., 2010), međutim o njihovom se kompleksnom djelovanju još uvijek vrlo malo zna.

Cilj ovog istraživanja bio je ustanoviti uzročnike djelomičnog ili potpunog sušenja stabala maslina na području istarskog poluotoka.

MATERIJALI I METODE RADA

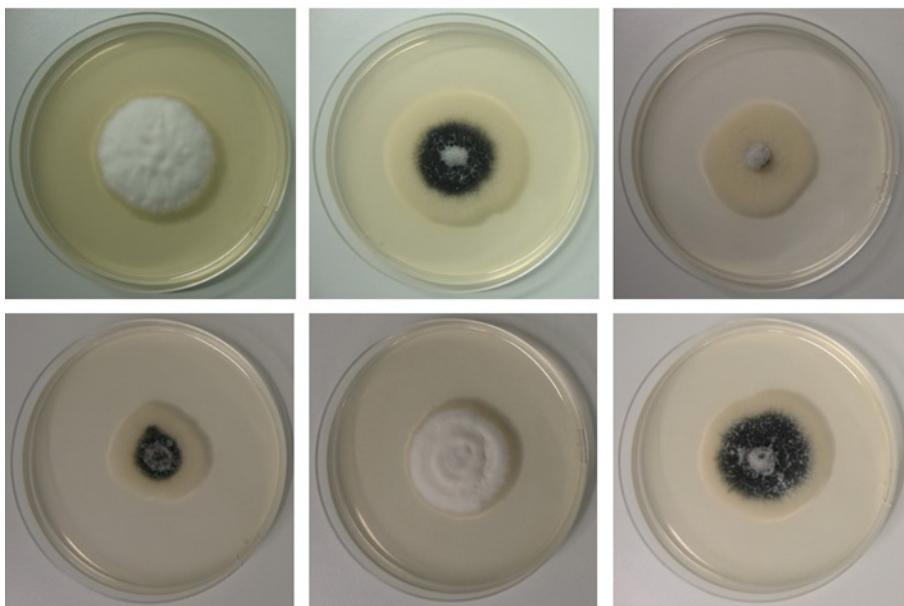
Istraživanje djelomičnog ili potpunog sušenja stabala maslina provedeno je na području istarskog poluotoka unutar četiriju maslinarskih uzgojnih područja (bujsko-umaško, porečko-vrsarsko, rovinjsko i vodnjansko-pulsко). Vizualnim pregledima stabala pratili su se simptomi poput promjene boje listova, djelomičnog ili potpunog sušenja stabala, pojave rak-rana na izbojima, promjene boje ksilema ili floema, nekroze kambija ili patoloških promjena na korijenovom vratu. Sa stabala na kojima su uočeni navedeni simptomi prikupljeni su uzorci biljnog materijala radi laboratorijskih analiza. Uzorkovanje je provedeno u maslinicima na ukupno 23 lokacije. Tijekom dvogodišnjeg

istraživanja ustanovljen je veći broj fitopatogenih gljiva za koje se u literaturi navodi da su povezane s djelomičnim ili potpunim sušenjem stabala masline (Úrbez-Torres i sur. 2013; Jiménez-Díaz i sur., 2012; López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011). U bujsko-umaškom i porečko-vrsarskom maslinarskom uzgojnom području uzorkovanje je provedeno na tri, u rovinjskom na devet, a u vodnjansko-pulskom na osam lokacija. Uzorci biljnog materijala, različitog sortimenta i starosti, prikupljeni su, (ujedno su se obavili i vizualni pregledi), od rujna do prosinca 2016. i u srpnju 2017., a uzorci su analizirani u mikološkom laboratoriju Zavoda za zaštitu bilja (HCPHS) u Zagrebu. Simptomatični dijelovi korijena, kore korijenovog vrata, grana ili dijelova debla izrezani su i površinski sterilizirani potapanjem u 70 %-tni etanol te inokulirani na krumpir-dekstrozni agar (KDA) i agar s mrkvom. Nakon inkubacije od 10 do 30 dana na 25 °C, analizirana je morfologija kolonija dobivenih inokulacijom. Odabrani su izolati izolirani kao čiste kulture na KDA te im je nakon inkubacije, identične prethodno opisanoj, analizirana morfologija kolonija i spora. Na temelju morfologije kolonija u čistoj kulturi te izgleda, veličine i boje spora provedena je identifikacija gljiva do razine roda ili vrste. Za identifikaciju su korišteni opisi Phillipsa i sur. (2013), Jiménez-Díaza i sur. (2012) te OEPP/EPPO-a (2007). Za lančanu reakciju polimerazom (PCR) korištene su početnice ITS1/ITS4 (White i sur., 1990) ili EF728F/EF986R (Úrbez-Torres i sur., 2013). Ukupna DNA iz izolata ekstrahirana je kompletom DNEasy Plant Mini Kit® (Qiagen Inc., SAD) prema uputama proizvođača, a PCR reakcije provedene su prema parametrima umnožavanja kako opisuju Úrbez-Torres i sur. (2013) te White i sur. (1990). Sekvence su uređene u programu Sequencher® (Gene Codes Corporation, SAD) i uspoređene sa sekvencama iz GenBank® baze podataka. Nakon provedene dijagnostike, kod stabala kod kojih su ustanovljeni patogeni koji napadaju korijen masline, prikupljeni su i uzorci tla sondom s dubine od 30 cm radi određivanja nekih kemijskih svojstava u Pedološkom laboratoriju Instituta za poljoprivredu i turizam. Uzorci tla za kemijske analize prikupljeni su na 12 lokacija, a ustanovljena im je pH reakcija (elektrometrijski) te količina makroelemenata N (modificirana metoda po Kjeldahlu), P i K (AL metoda) i količina organske tvari (metoda po Tjurinu). Uzorkovanje je provedeno na pet lokacija u rovinjskom, četiri u vodnjansko-pulskom, dvije u bujsko-umaškom i na jednoj u porečko-vrsarskom maslinarskom uzgojnom području.

REZULTATI I RASPRAVA

Na 23 lokacije ukupno je sakupljeno 78 izolata (103 uzoraka), među kojima je najčešća vrsta bila *Verticillium dahliae* (Slika 1.). Gljiva *V. dahliae* redovito je izolirana iz grana stabala sa simptomima djelomičnog ili potpunog sušenja, slabijeg rasta ili slabijeg vigora. Ista se drži najvažnijim uzročnikom bolesti masline u svijetu (Jiménez-Díaz i sur., 2012; López-Escudero i Mercado-Blanco, 2011). U Hrvatskoj je prvi put potvrđena na maslini tek nedavno (Kaliterina i

sur., 2016a), a rezultati ovog istraživanja potvrđuju da je raširena i na istarskom poluotoku. Ustanovljena je u maslinicima na 13 istraživanih lokacija (što čini 57 % od ukupnog broja lokacija), pri čemu je izolirana iz 28 simptomatičnih stabala. Gljiva *V. dahliae* pronađena je u maslinicima u okolini Rovinja, Bala, Baredina, Vodnjana, Labina i Marčane.



Slika 1. *Verticillium dahliae*, izolati Ver/Sg4, Ver/Sg7, Ver/SG8, Ver/SG9, Ver/SG21 i Ver/SG26 na KDA nakon 7 dana inkubacije

Fig. 1 *Verticillium dahliae*, Ver/Sg4, Ver/Sg7, Ver/SG8, Ver/SG9, Ver/SG21 and Ver/SG26 isolates on PDA 7 days after incubation

Gljiva *Armillaria mellea* sensu lato ustanovljena je u maslinicima u okolini Bala, Višnjana, Vodnjana i Butonige, na četiri istraživane lokacije (odnosno 17 %). Stabla zahvaćena ovom gljivom bila su ili potpuno osušena ili su na njima bili vidljivi simptomi sušenja i propadanja te simptomi truljenja na korijenovom vratu (Slika 2.).



Slika 2. Simptomi na korijenovom vratu uzrokovani vrstom *Armillaria mellea*, 27. 10. 2016.

Fig. 2 Symptoms on root neck caused by species *Armillaria mellea*, October 27th 2016.

Iz nekrotičnih lezija i rak-rana na simptomatičnim stablima izolirano je nekoliko izolata za koje je analizom morfologije ustanovljeno da pripadaju porodici Botryosphaeriaceae. Izolate, koji su pripadali rodu *Diplodia*, nije bilo moguće identificirati do razine vrste pa su analizirani sekvenciranjem dijela ITS1-5.8S-ITS2 ribosomske DNA ili dijela gena translacijskog elongacijskog faktora 1α. Sakupljena su četiri izolata, od kojih su tri identificirana kao *Diplodia seriata*. Vrsta *D. seriata* ustanovljena je na trima lokacijama (13 %), a već je zabilježena kao uzročnik sušenja masline u Hrvatskoj (Kaliterna i sur., 2012). U okviru ovog istraživanja, osim spomenutih, nađene su i druge vrste gljiva o čijoj se ulozi uzročnika bolesti na maslini još uvijek malo zna.

Najveći broj dijagnosticiranih fitopatogenih gljiva izoliran je iz stabala istarske sorte Buža, različite starosti. Prema geografskoj raširenosti, vrsta *V. dahliae* ustanovljena je u svim maslinarskim uzgojnim područjima obuhvaćenim ovim istraživanjem. Rezultati istraživanja pokazuju kako je najzastupljenija u rovinjskom maslinarskom uzgojnom području. Prisutnost *A. mellea* također je ustanovljena u svim maslinarskim uzgojnim područjima, dok je vrsta *D. seriata* zabilježena samo u maslinicima u okolini Rovinja i Bala. Prema istraživanju López-Escudera i Mercado-Blanca (2011), sorta Leccino osjetljiva je, dok je sorta Frantoio otporna na verticilijsko venuće. Osim verticilijskog venuća, ekonomski štetnom bolesti masline u Istri može se smatrati i trulež korijena uzrokovan gljivom *Armillaria mellea* (Ivić i Godena, 2017).

Prema autorima López-Escudera i Mercado-Blanca (2011), tla kisele reakcije (< pH 5,5) inhibiraju rast vrste *V. dahliae* te stvaranje i opstanak mikrosklerocija. Isti autori navode da se ovaj patogen obično razvija u tlu

neutralne do alkalne reakcije tla (pH 6-9), dok povećanje kalija u tlu dovodi do ublažavanja bolesti koje uzrokuje. Rezultati ovog istraživanja podudaraju se s rezultatima navedenih autora. Uzorci tla prikupljeni u maslinicima u kojima je dijagnosticirana spomenuta fitopatogena gljiva bili su slabo kisele do alkalne reakcije (pH 6,40-8,10), najniži pH zabilježen je u rovinjskom, a najviši u bujsko-umaškom uzgojnem području. S obzirom na biljci pristupačan kalij, navedena su tla većinom bila dobro ili bogato opskrbljena tim makroelementom (17,0 - 35,0 K₂O/100 g tla), dok je jedan uzorak kod kojeg je ustanovljena gljiva *A. mellea* imao izraziti višak toga elementa (>45,0 K₂O/100 g tla). Najniža količina kalija ustanovljena je u bujsko-umaškom, a najviša u rovinjskom i vodnjansko-pulskom uzgojnem području. Isto tako, tla su bila dobro opskrbljena dušikom (0,11 - 0,19 %), dok su količine fosfora u tlu najviše varirale (2,84 - 37,17 mg P₂O₅/ 100 g tla), od vrlo slabo u bujsko-umaškom do bogato opskrbljenog tla u vodnjansko-pulskom uzgojnem području. Količina organske tvari kretala se od 1,86 % (slabo humusno tlo) do 4,46 % (humusno tlo).

ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem potvrđeno je da su gljivične bolesti uzročnici djelomičnog ili potpunog sušenja stabala maslina na istarskom poluotoku. Većina biljnih bolesti obuhvaćenih ovim istraživanjem u Hrvatskoj još nije sustavno opisana niti je njihova raširenost i štetnost zasad istraživana. Prema simptomima uočenima u maslinicima te vrstama gljiva izoliranim iz simptomatičnih stabala, nameće se zaključak kako su bolesti, opisane u drugim područjima svijeta, prisutne i na području Istre. Riječ je o verticilijskom venuču čiji je uzročnik gljiva *Verticillium dahliae*, bortriosferijskom raku koji uzrokuje gljiva *Diplodia seriata* i truleži korijena koju uzrokuje gljiva *Armillaria mellea*. U okviru ovog istraživanja osim spomenutih nađene su i druge vrste gljiva, čija je uloga uzročnika bolesti na maslini malo poznata.

Među identificiranim gljivama u ovom istraživanju najvažnija je *V. dahliae*. Prisutnost i raširenost ovog patogena masline u Istri može predstavljati ozbiljan problem. Mjere zaštite protiv verticilijskog venuča masline ograničene su, a bolest može biti vrlo štetna. Osjetljivost najvažnijih istarskih sorti masline na tu bolest nije poznata, a mjere poput korištenja certificiranog sadnog materijala, solarizacije tla ili primjena bioloških pripravaka za zaštitu korijena od fitopatogenih gljiva još nisu prihvaćene u lokalnoj maslinarskoj praksi.

Ustanovljivanje uzročnika bolesti djelomičnog ili potpunog sušenja masline prvi je korak u izradi strategije zaštite u okviru održive i tehnološki napredne proizvodnje maslina u Istri. Navedena bi strategija u budućnosti, uz učinkovite mjere zaštite, doprinijela povećanju kakvoće i količine proizvodnje maslina te smanjenju rizika u proizvodnji, a proizvođače bi upoznala s novim problemima i mogućnostima njihovog suzbijanja.

LITERATURA

- BJELIŠ, M. (2009). Zaštita masline u ekološkoj proizvodnji, Solin, vlastita naklada.
- DRŽAVNI ZAVOD ZA STATISTIKU (2016). Statistički Ijetopis Republike Hrvatske 2016., Zagreb, 271., https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/Ijetopis/2016/sljh2016.pdf (pristupljeno: 23.10.2017.)
- GARCÍA-RUIZ; G. M., TRAPERO; C., VARO-SUAREZ A., TRAPERO, A., LÓPEZ-ESCUDERO, F. J. (2015). Identifying resistance to *Verticillium* wilt in local Spanish olive cultivars. *Phytopathol. Mediterr.*, Vol. 54, 3: 453-460.
- GAŠPAREC-SKOČIĆ, LJ., MILAT, V. (2011.) Maslinarstvo i uljarstvo u RH: Maslina, najvažnija voćka hrvatskog uzmorja. U: *Maslina i maslinovo ulje: Božji dar u Hrvata* (Lj. Gašparec-Skočić i V. Milat ur.). Zagreb. Mavi d.o.o., pp 58-68.
- IVIĆ, D., GODENA, S. (2017). *Armillaria mellea* na maslini i nove perspektive u zaštiti od truleži korijena. *Glasilo biljne zaštite*, Vol. 17, 4: 378-383.
- IVIĆ, D., IVANOVIĆ, A., MILIČEVIĆ, T., CVJETKOVIĆ, B. (2010). Shoot necrosis of olive caused by *Phoma incompta*, a new disease of olive in Croatia. *Phytopathol. Mediterr.*, Vol. 49, 3: 414-416.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M., CIRULLI, M., BUBICI, G., JÍMENEZ-GASCO, M. DEL M., ANTONIOU, P. P., TJAMOS, E. C. (2012). *Verticillium* wilt, a major threat to olive production: Current status and future prospects for its management. *Plant. Dis.*, 96: 304-329.
- KALITERNA, J., MILIČEVIĆ, T. (2012). Bolesti maslina uzrokovane fitopatogenim gljivama iz porodice *Botryosphaeriaceae*. *Glasilo biljne zaštite*, Vol. 12, 4: 361-366.
- KALITERNA, J., MILIČEVIĆ, T., BENČIĆ, Đ., MEŠIĆ, A. (2016a). First Report of *Verticillium* Wilt Caused by *Verticillium dahliae* on Olive Trees in Croatia. *Plant. Dis.*, Vol. 100, 12: 2526.
- KALITERNA, J., MILIČEVIĆ, T., BENČIĆ, Đ., MEŠIĆ, A. (2016b). Sušenje masline uzrokovano gljivom *Verticillium dahliae* Kleb. u Istri. *Glasilo biljne zaštite*, Vol. 16, 6: 557-562.
- KALITERNA, J., MILIČEVIĆ, T., IVIĆ, D., BENČIĆ, Đ., MEŠIĆ, A. (2012). First report of *Diplodia seriata* as causal agent of olive dieback in Croatia. *Plant. Dis.*, Vol. 96, 2: 290-290.
- LÓPEZ-ESCUDERO, F. J.; MERCADO-BLANCO, J. (2011). *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil*, 344: 1-50.
- LORETO, F., BURDSALL, JR. H. H., TIRRO', A. (1993). Armillaria Infection and Water Stress Influence Gas-exchange Properties of Mediterranean Trees. *Hortic. Sci.*, Vol. 28, 3: 222-224.
- MORAL, J., MUÑOZ-DÍEZ, C., GONZÁLEZ, N., TRAPERO, A., MICHAELIDES, T. J. (2010). Characterization and Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* Species Collected from Olive and Other Hosts in Spain and California. *Phytopathology*, Vol. 100, 12: 1340-1351.
- OEPP/EPPO (2007). EPPO Standard PM 7/78 (1) *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* on hop. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 37: 528-535.
- PHILLIPS, A. J. L., ALVES, A., ABDOLLAHZADEH, J., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M. J., GROENEWALD, J. Z., CROUS, P. W. (2013). The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76: 51-167.

SINGLETON, L. J., MIHAIL, J. D., RUSH, C. M. (1992). Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi, St. Paul, Minnesota, APS.

ÚRBEZ-TORRES, J.R., PEDUTO, F., VOSSEN, P. M., KRUEGER, W. H., GUBLER, W. D. (2013). Olive twig and branch dieback: etiology, incidence and distribution in California. *Plant Dis* 97: 231-244.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. U: PCR protocols: A guide to methods and applications (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ ur.). New York. Academic Press Inc., pp. 315-322.