



# 7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios  
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia  
Cáceres, Extremadura

---

---

7CFE01-479

---

---

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales  
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017  
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

## Detección de hongos de la familia Botryosphaeriaceae en especies forestales.

PINTOS VARELA, C., REDONDO FERNÁNDEZ, V., AGUÍN CASAL, O., COSTAS IMBERNÓN, D. y MANSILLA VÁZQUEZ, J.P.

Estación Fitopatológica Areeiro. Deputación Pontevedra

### Resumen

Los hongos de la familia Botryosphaeriaceae son importantes patógenos que afectan a numerosas especies forestales, ocasionando alguno o varios de los siguientes síntomas: canchros, exudados, seca de ramas, ramillos y hojas, decaimiento general o mortalidad de la planta. El objetivo de este trabajo consistió en la caracterización de los aislados fúngicos, pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae, detectados en muestras sintomáticas forestales recibidas en el laboratorio de la Estación Fitopatológica Do Areeiro desde el año 2011. Las muestras se sembraron en medios de cultivo generales en condiciones estériles y se incubaron a 24°C en oscuridad. Los aislados obtenidos fueron identificados mediante el estudio de sus características morfológicas y culturales en medios de cultivo específicos y por técnicas moleculares. El análisis molecular se realizó por amplificación, secuenciación y análisis filogenético de la región ITS del ADN ribosomal y de un fragmento del gen del factor de elongación 1-alfa (EF1-a). En total se han identificado 13 especies (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia alatafructa*, *D. fraxini*, *D. mutila*, *D. sapinea*, *D. seriata*, *Dothiorella iberica*, *Do. sarmentorum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *N. eucalyptorum*, *N. luteum*, *N. mediterraneum* y *N. parvum*) en un número elevado de huéspedes forestales como eucaliptos, quercíneas o pinos. *Botryosphaeria dothidea* y *Neofusicoccum parvum* fueron las especies detectadas con mayor frecuencia.

### Palabras clave

*Botryosphaeria*, *Diplodia*, filogenia, morfología, *Neofusicoccum*

## 1. Introducción

La familia Botryosphaeriaceae incluye alguno de los más importantes hongos patógenos que afectan a especies arbóreas (BEGOUDE *et al.* 2010). Presentan una distribución muy cosmopolita suponiendo una creciente amenaza para los ecosistemas forestales de clima mediterráneo (LINALDEDDU *et al.* 2016). La infección puede producirse por la penetración vía estomática, a través de heridas mecánicas o, debido a su carácter endófito, por el crecimiento oportunista de estos hongos ante situaciones de estrés tanto bióticas como abióticas. Los síntomas que producen incluyen: decaimientos de la parte aérea, seca de ramas y ramillos, canchros en ramas y troncos, pudrición de frutos, decaimiento general e incluso la muerte de la planta (ZLATKOVIC *et al.* 2010). Los recientes avances en las técnicas moleculares han proporcionado herramientas eficientes para la caracterización e identificación de las especies de la familia Botryosphaeriaceae (SLEEPERS & WINGFIELD, 2007, PHILLIPS *et al.* 2013). Actualmente se incluyen 23 géneros de hongos dentro de esta familia (DISSANAYAKE *et al.* 2016) aunque su sistemática está en continua revisión. En los últimos cinco años hubo un incremento significativo en el número de muestras forestales que llegaron a la Estación Fitopatológica Areeiro (EFA) con síntomas asociados a estos hongos.

## 2. Objetivos

El objetivo de este estudio fue identificar, por morfología y técnicas moleculares, las especies de la familia Botryosphaeriaceae que afectaban a muestras de árboles forestales, tanto a frondosas como a coníferas, recibidas en el laboratorio de la EFA durante el período 2011-2016.

### 3. Metodología

Las muestras sintomáticas recibidas en nuestro laboratorio, se dispusieron en cámara húmeda, para ello, la muestra vegetal se introdujo en un recipiente cerrado de vidrio o plástico sobre papel de filtro humedecido y se incubó a 25 °C con la intención de forzar la esporulación de las fructificaciones características de este tipo de hongos: picnidios y/o peritecios para su posterior estudio bajo lupa y microscopio. (Figura 1: b, d y f; Figura 2: a, i, j y k)



Figura 1. Síntomas y signos en diferentes especies forestales: *Pinus pinaster* (a, b, c); a: fructificaciones de *Botryosphaeriaceae* sp. en piña. b: fructificaciones de *Botryosphaeriaceae* sp. en madera. c: cancro resinoso. *Quercus robur* (d) fructificaciones de *Botryosphaeriaceae* sp. en cancro. *Eucalyptus globulus* (e, f, g); e: cancro. f: fructificaciones de *Botryosphaeriaceae* sp. sobre madera. g: necrosis

Así mismo las muestras fueron sembradas en medio de cultivo. Para la siembra se procedió de la siguiente forma: el material vegetal sintomático fue desinfectado en una solución de hipoclorito sódico al 1% durante 5 minutos y posteriormente aclarado con dos lavados sucesivos en agua destilada durante 10 minutos. Una vez lavadas las muestras se dejaron secar y se sembraron en medio de cultivo agar-malta con estreptomycin (AMs) en condiciones estériles. Las placas se incubaron a 24°C en oscuridad durante 2 semanas. Transcurrido un periodo de 24h de incubación se comenzó la observación bajo microscopio óptico y en los casos en los que se apreció la presencia de micelio característico de la familia *Botryosphaeriaceae* (micelio oscuro y tabicado) fue repicado a patata dextrosa agar (PDA). Los cultivos monospóricos de los aislados se obtuvieron a partir de la siembra de soluciones seriadas de esporas del hongo en medio PDA con estreptomycin. Los hongos de esta familia no fructifican directamente en medio de cultivo y para forzar su esporulación

repicamos el micelio a medio agar agua con acículas de pino estériles (CROUS *et al.* 2006). Las placas se incubaron bajo ciclos alternantes de 12h luz + ultravioleta cercano y 12h de oscuridad para estimular la formación de picnidios (Figura 2: a). Las características de los cultivos y de los conidios fueron determinantes para clasificar estos hongos a nivel de género, si bien, para llegar a especie o para su confirmación fue necesario el uso de técnicas moleculares.

El estudio molecular se llevó a cabo mediante la amplificación, secuenciación y análisis filogenético de la región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal (ITS) y una parte de la secuencia del gen del factor de elongación 1 $\alpha$  (gen EF-1 $\alpha$ ). El ADN genómico se extrajo a partir de micelio en cultivo mediante el kit comercial E.Z.N.A.<sup>®</sup> Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-tek) siguiendo el protocolo corto recomendado por el fabricante. La región ITS del ADN molde se amplificó con los cebadores ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990), mientras que para amplificar parte del gen EF1- $\alpha$  se emplearon los cebadores EF1-728F y EF1-986R (CARBONE & KOHN, 1999). Las reacciones de PCR se realizaron introduciendo 1  $\mu$ L del DNA molde en un tubo Illustra<sup>™</sup> PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) conteniendo 0,5  $\mu$ L de cada cebador (10  $\mu$ M) que se completó con agua estéril hasta un volumen final de 25  $\mu$ L. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies) siguiendo las condiciones propuestas por ALVES *et al.* (2004) y PHILLIPS *et al.* (2005) para amplificar la región ITS y parte del gen EF-1 $\alpha$ , respectivamente. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos (sin DNA molde), así como controles positivos que consistieron en cepas de referencia de Botryosphaeriaceae spp. pertenecientes a la colección de la Estación Fitopatológica Areeiro. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v) en tampón TBE 0,5X a 120 V durante 30 minutos. Los geles se tiñeron con Midori Green (NIPPON Genetis Europe) y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. Los productos de PCR se purificaron con el kit Illustra ExoProStar 1-Step<sup>™</sup> (GE Healthcare Life Sciences) y las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo utilizando el Big Dye<sup>®</sup> Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) en un termociclador bajo las siguientes condiciones: 96 °C 1 min, 25 ciclos a 96 °C 10 s, 50 °C 5 s, y 60 °C 4 min. Los productos de secuenciación obtenidos fueron precipitados en etanol, desnaturalizados en formamida a 94 °C 3 min y se cargaron en un secuenciador automático ABIPrism<sup>®</sup> 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Para cada aislado y para cada región se obtuvo la secuencia consenso a partir de las secuencias generadas con cada uno de los cebadores. Las secuencias se leyeron y editaron con el software Bioedit v. 7.0.9 (HALL, 1999) y se verificaron manualmente. Posteriormente se compararon con secuencias relacionadas incluidas en la base de datos NCBI, utilizando el algoritmo Megablast en el programa Blastn para la búsqueda de homologías (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

El análisis filogenético se realizó con secuencias de las regiones ITS y EF1- $\alpha$ , seleccionando un aislado como representativo de cada una de las especies identificadas. Las secuencias se alinearon con ClustalX v. 1.83 (Thompson *et al.* 1997) y la reconstrucción filogenética se llevó a cabo por inferencia de un árbol construido por el método de Neighbor-Joining utilizando el *Maximum Composite Likelihood* como modelo de sustitución nucleotídica. La robustez del árbol se evaluó a través del método *bootstrap* utilizando un número de réplicas igual a 1000. El análisis filogenético de los datos se realizó mediante el software MEGA7 (KUMAR *et al.* 2016).

#### 4. Resultados

Desde 2011 se registraron un total de 78 muestras de huéspedes forestales sintomáticas de esta patología. Se obtuvieron 90 aislados pertenecientes a 5 géneros: *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum*. Morfológicamente los conidios de estos aislados mostraron una gran variación entre géneros y especies, fundamentalmente nos encontramos dos tipos: Tipo Fusicoccum: forma ovoide, elíptica o fusiforme normalmente hialinos, aseptados y con pared delgada que en ocasiones engrosa, oscurece y tabica (Figura 2: a-h), y Tipo Diplodia: de pared gruesa, en su mayoría ovoide con los extremos redondeados, aseptados o con 1 septo, en ocasiones

pueden presentar 2 y 3 septos y de coloración hialina o marrón (Figura 2: l-q). El crecimiento de los hongos en medio de cultivo PDA nos aporta datos significativos para la correcta identificación de las especies: temperaturas cardinales de crecimiento, coloraciones, forma de la colonia, densidad del micelio etc. La coloración de *Neofusicoccum luteum* es tan característica que su crecimiento en medio podría ser suficiente para su identificación (Figura 2: f).



Figura 2. Características morfológicas y culturales de los hongos de la familia Botryosphaeriaceae. a: picnidio de *Neofusicoccum* sp.; b: conidios de *B. dothidea*; c: conidios de *N. eucalyptorum*.; d: conidios de *N. luteum*.; e: conidio tabicado y oscurecido de *N. mediterraneum*; f: reverso de la colonia de *N. luteum* en PDA; g-h: conidios de *Dichomera* sp.; i-j-k: corte transversal del ascomiceto, peritecios y ascas con parafisos; l: conidio hialino de *Diplodia* insertado en el conidióforo; m: conidio de *Diplodia seriata* que puede oscurecer sobre el conidióforo; n: conidios de *Dothiorella* que oscurecen y tabican en el conidióforo; o: estriaciones longitudinales que forman al oscurecer las especies de *Lasiodiplodia*; p-q: variaciones morfológicas de las especies de *Diplodia*.

La identificación a nivel de especie se llevó a cabo por la comparación de las regiones secuenciadas ITS y gen EF-1 $\alpha$  de nuestros aislados con las secuencias depositadas en el GenBank para ambas regiones. Se identificaron 13 especies de Botryosphaeriaceae diferentes donde *Botryosphaeria dothidea* y *Neofusicoccum parvum* fueron las especies más frecuentemente detectadas con un 15 y 14% respectivamente. Además ambas especies demostraron ser muy polífagas encontrándose cada una de ellas en 6 huéspedes diferentes (Tabla 1).

Tabla 1. Relación de especies de Botryosphaeriaceae identificadas en huéspedes forestales:

FAMILIA	GÉNERO	ESPECIES DE BOTRYOSPHAERIACEAE DETECTADAS	
CONÍFERAS	Araucariaceae	<i>Araucaria</i>	<i>N. luteum</i> ; <i>Diplodia</i> sp.*
		<i>Chamaecyparis</i>	<i>N. parvum</i>
		<i>Cunninghamia</i>	<i>Diplodia</i> sp.*
	Cupressaceae	<i>Sequoia</i>	<i>Diplodia</i> sp.*
		<i>Sequoiadendron</i>	<i>N. luteum</i> ; <i>N. parvum</i>
		<i>Thuja</i>	<i>N. luteum</i> ; <i>B. dothidea</i> ; <i>Do. iberica</i>
		<i>Cedrus</i>	<i>D. sapinea</i>
	Pinaceae	<i>Picea</i>	<i>D. mutila</i>
		<i>Pinus</i>	<i>D. sapinea</i>
<i>Pseudotsuga</i>		<i>D. sapinea</i>	
FRONDOSAS	Fagaceae	<i>Castanea</i>	<i>B. dothidea</i> ; <i>D. alatafructa</i> ; <i>D. mutila</i> ; <i>D. seriata</i>
		<i>Quercus</i>	<i>Diplodia</i> sp.; <i>Do. sarmentorum</i> ; <i>N. parvum</i>
	Juglandaceae	<i>Juglans</i>	<i>B. dothidea</i> ; <i>D. mutila</i>
	Magnoliaceae	<i>Liriodendron</i>	<i>N. parvum</i>
	Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i>	<i>B. dothidea</i> ; <i>D. mutila</i> ; <i>N. eucalyptorum</i> ; <i>N. mediterraneum</i> ; <i>N. parvum</i>
		Oleaceae	<i>Fraxinus</i>
	<i>Olea</i>		<i>B. dothidea</i> , <i>D. mutila</i> ; <i>D. seriata</i> ; <i>N. parvum</i>
	Platanaceae	<i>Platanus</i>	<i>D. seriata</i> ; <i>N. parvum</i>
	Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>Diplodia</i> sp.*
	Salicaceae	<i>Salix</i>	<i>D. mutila</i> ; <i>N. luteum</i>
		Sapindaceae	<i>Acer</i>
	<i>Aesculus</i>		<i>B. dothidea</i> ; <i>L. theobromae</i>
	Ulmaceae	<i>Ulmus</i>	<i>D. sarmentorum</i>

\*: Identificación basada únicamente en técnicas morfológicas

El alineamiento del conjunto de datos compuesto por 13 aislados y 27 secuencias obtenidas del GenBank consistió en un total de 1878 caracteres de los cuales 996 fueron constantes, 393 variables y 259 parsimonia-informativos. El árbol Neighbour-Joining mostró un alto grado de agrupamiento en clados de los aislados analizados (Figura 3). Se obtuvieron un total de 5 clados diferenciados que representan a los géneros *Neofusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Diplodia* y *Botryosphaeria*.

Todos los clados mostraron valores de *bootstrap* de moderados a altos (>70%), a excepción del correspondiente al género *Neofusicoccum*, con un bajo valor de *bootstrap*. La mayor parte de los aislados analizados se agruparon con los clados *Neofusicoccum* y *Diplodia*. Los aislados EFA 01, EFA 02, EFA 03 y EFA 04 quedaron incluidos dentro del grupo *Neofusicoccum*, formando los subgrupos de *N. mediterraneum*, *N. luteum*, *N. parvum* y *N. eucalyptorum*, respectivamente, con altos valores de *bootstrap*. Dentro del género *Diplodia* se incluyeron los aislados EFA 08, EFA 09, EFA 10 y 12 que se agruparon junto con aislados del GenBank correspondientes a las especies *D. fraxini*, *D. mutila*, *D. sapinea* y *D. seriata* respectivamente. Sin embargo, la posición de *D. alatafructa* no quedó claramente resuelta, formando un subgrupo junto con otro aislado del GenBank con un bajo soporte *bootstrap*.

El género *Botryosphaeria* se mostró claramente diferenciado del resto en un clado aparte en el que quedó incluido el aislado EFA 14, soportado por un valor de *bootstrap* del 100%. Las posiciones de EFA 05, EFA 06 y EFA 07 también quedaron claramente definidas junto a los subgrupos de *Do. sarmentorum*, *Do. iberica* y *L. theobromae*, respectivamente.

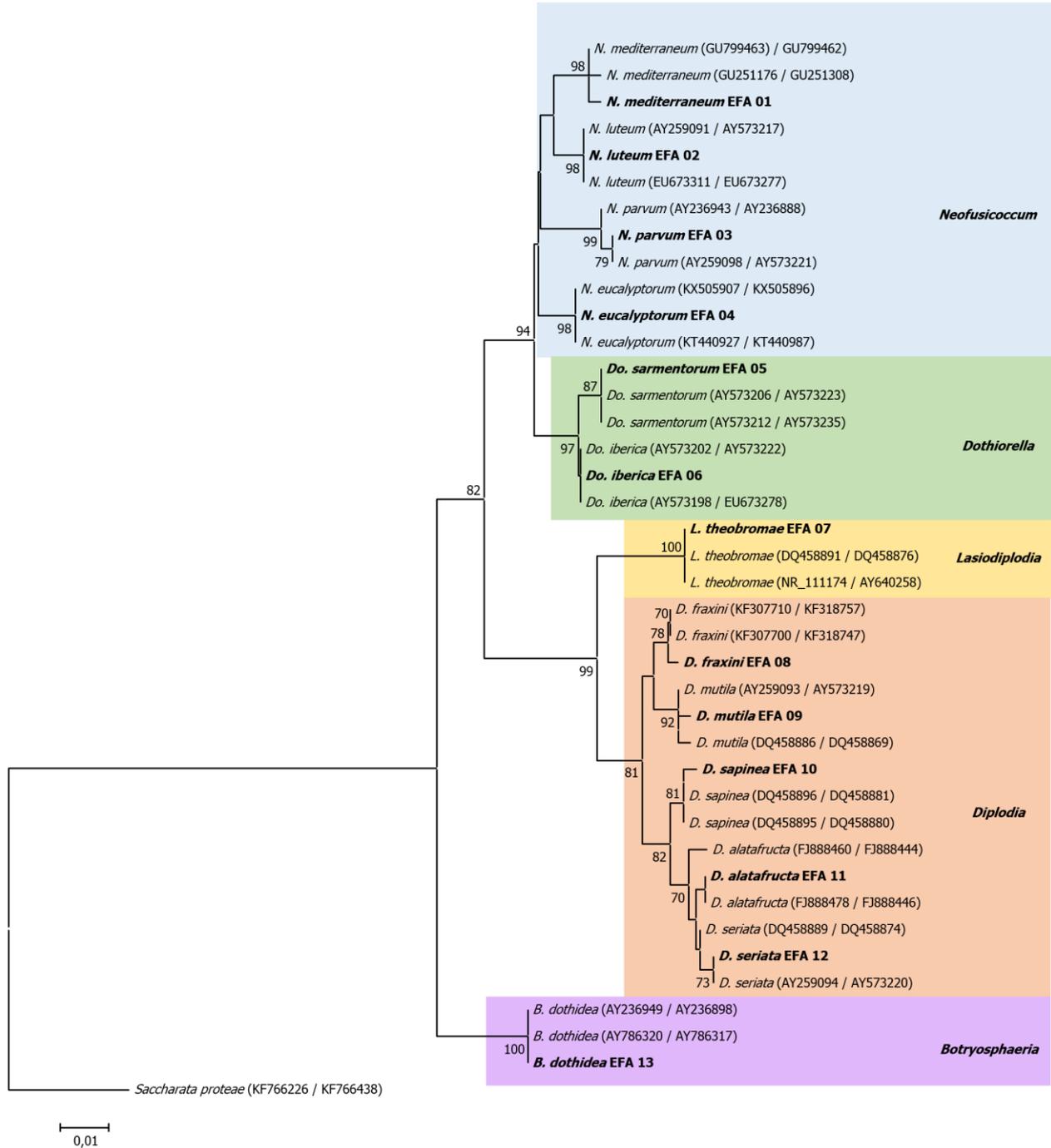


Figura 3. Árbol Neighbor-Joining inferido a partir del análisis combinado de secuencias concatenadas de la región ITS y parte del gen EF1- $\alpha$ . La barra de escala representa el número de cambios nucleotídicos y los valores de soporte bootstrap (>70 %) de 1000 réplicas se muestran en los nodos. Entre paréntesis se presentan los números de acceso del GenBank de cada secuencia para las regiones ITS y EF1- $\alpha$ , respectivamente. Las cepas en negrita se corresponden con los aislados representativos de este estudio. Se utilizó *Saccharata proteae* como grupo externo.

## 5. Discusión

En este estudio se han detectado, por características morfológicas y por técnicas moleculares, 13 especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae a partir del análisis de 90 aislados. La filogenia basada en el análisis combinado de las regiones ITS y EF1- $\alpha$  permitió la identificación de las especies estudiadas, quedando incluidas en clados bien diferenciados y agrupando junto con otros aislados analizados en estudios previos (PHILLIPS *et al.* 2013).

Durante muchos años estos hongos se identificaron en función de las características morfológicas de sus anamorfos y teleomorfos, por lo que es frecuente encontrar, en la antigua bibliografía, referencias a los géneros *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Fusicoccum* o *Sphaeropsis*. Así por ejemplo en FARR (1989), aparecen citadas decenas de especies afectando a una multitud de especies forestales, basándose su identificación fundamentalmente en las características morfológicas del hongo y el huésped al que parasitaba, así podemos encontrar varias especies de Botryosphaeriaceae afectando a determinados huéspedes que coinciden con los estudiados en nuestro trabajo. La nomenclatura de estos hongos ha ido variando sobre todo gracias a los últimos avances moleculares y es por ello que, en algunos casos, podría parecer que se trata de una nueva detección cuando en realidad sólo ha cambiado su clasificación y nomenclatura. Además, en el caso concreto de esta familia de hongos, la identificación a nivel de especie es muy complicada debido a la presencia de especies crípticas: son especies morfológicamente idénticas pero que difieren en su filogenia, rango de huéspedes, patogenicidad y a veces en su distribución (CHETHANA *et al.* 2016)

En general las especies detectadas son hongos polípagos y presentan una distribución bastante cosmopolita, si bien, algunas especies como *Neofusicoccum eucalyptorum* o *Diplodia sapinea* muestran una alta especificidad por su hospedador (DISSANAYAKE *et al.* 2016). El estudio de estos hongos en especies forestales queda bastante limitado al valor económico en sí, encontrándonos más referencias en especies del género *Eucalyptus*, *Quercus* o *Pinus* que de otros huéspedes (ZLATKOVIC, *et al.* 2010) que, en nuestro caso, también son las muestras que nos llegaron en mayor abundancia

## 6. Conclusiones

Se sabe que los hongos de la familia Botryosphaeriaceae son causa de decaimiento y muerte de numerosas especies forestales. Es necesario determinar su impacto en nuestras masas arboladas realizando prospecciones tanto de las especies principales como de las secundarias debido al carácter polípagos de estos hongos. Las especies forestales, además, son especialmente sensibles a estas enfermedades debido a que los trabajos selvícolas favorecen la penetración de estos patógenos vía heridas de poda.

## 7. Agradecimientos

Los autores agradecen a Dña. Ana García Servia y a D. Bernabé Peón Pose, técnicos de la Estación Fitopatológica do Areeiro, su labor en el procesamiento de las muestras.

## 8. Bibliografía

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* . 215:403-410
- ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J.; PHILLIPS, A.J.L. 2004. *Botryosphaeria corticola* sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph *Diplodia mutila*. *Mycologia* 96:598–613
- BEGOUDE, B.A.D.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J.; ROUX, J; 2010. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycological Progress*. 9(1):101-123
- CARBONE, I.; KOHN, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*. 91:553–556
- CHETHANA, K.W.T.; PHILLIPS, A.J.L.; ZHANG, W.; CHEN, Z.; HAO, Y.Y.; HYDE, K.D; LI, X.H.; YAN, J.Y. 2016. Mycosphere Essays 5: Is it important to name species of Botryosphaeriaceae?. *Mycosphere*. 7(7): 870-882
- CROUS, P.W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W.F.O. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*. 55: 235-253
- DISAANAYAKE, A.J.; PHILLIPS, A.J.L.; LI, X.H.; HYDE, K.D. 2016. Botryosphaeriaceae: Current status of genera and species. *Mycosphere*. 7 (7):1001-1073
- FARR, D.F; 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. APS press. 1252. St. Paul, Minnesota USA
- HALL, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*. 41:95–98
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33:1870-1874
- PHILLIPS, A.J.L.; ALVES, A.; CORREIA, A.; LUQUE, J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia*. 97:513–29
- 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(1):51-167
- SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J.; 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal biology reviews*. 21:90–106
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. 1997. The Clustal\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25: 4876–4882
- ZLATKOVIC, M.; KECA, N.; MILIJASEVIC, T. 2010. Symptoms of Botryosphaeriaceae on forest and shade trees in Serbia. First Serbian Forestry Congress. 1685-1691

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, CA, USA: Academic Press, 315-22