



Taxonomía y sistemática

## Descripción y distribución de *Hydnotrya cerebriformis* (Discinaceae: Pezizales) en México

*Description of Hydnotrya cerebriformis (Discinaceae: Pezizales) from Mexico*

Carolina Piña-Páez<sup>a,\*</sup>, Roberto Garibay-Orijel<sup>a</sup>, Gonzalo Guevara-Guerrero<sup>b</sup>  
y Michael A. Castellano<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-233, 04510 Ciudad de México, México

<sup>b</sup> Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, Av. Portes Gil 1301 Poniente, 87010 Ciudad Victoria, Tamaulipas, México

<sup>c</sup> Department of Agriculture, Forest Service, Northern Research Station, Forestry Sciences Laboratory, Corvallis, Oregon 97331, USA

Recibido el 5 de abril de 2016; aceptado el 20 de enero de 2017

Disponible en Internet el 3 de mayo de 2017

### Resumen

El género *Hydnotrya* comprende alrededor de 13 especies de Ascomicetos hipogeos, secuestrados ectomicorrízicos distribuidos exclusivamente en bosques templados del hemisferio norte. En este trabajo se describe e ilustra por primera vez una especie de este género, *Hydnotrya cerebriformis*, para México. Esta especie se distribuye en el Eje Neovolcánico Transmexicano (Estado de México, Puebla y Tlaxcala) y Nuevo León a altitudes entre los 3,100 y 4,000 m, donde se asocia a bosques de *Pinus hartwegii*, *P. montezumae* y *Abies religiosa*, principalmente.

© 2017 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Palabras clave:** Hongos secuestrados; Trufas; Pseudotrufas; Ascomycota

### Abstract

The genus *Hydnotrya* is composed of around 13 ectomycorrhizal, hypogeous, sequestered Ascomycetes distributed exclusively in temperate forests in the northern hemisphere. This work describes and illustrates for the first time a species of this genus, *Hydnotrya cerebriformis*, from Mexico. The species is distributed in the Transmexican Volcanic Belt (in the Estado de México, Puebla, and Tlaxcala) and the state of Nuevo León at altitudes between 3,100 and 4,000 m, and associated mainly with *Pinus hartwegii*, *P. montezumae*, and *Abies religiosa* forests.

© 2017 Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Keywords:** Sequester fungi; Truffles; False truffles; Ascomycota

### Introducción

El género *Hydnotrya* (Berk. y Broome) pertenece a la familia Discinaceae (Ascomycetes), donde también se encuentran los géneros *Discina* (Fr.) Fr., *Gymnohydnotrya* B.C. Zhang y

Minter y *Gyromitra* Fr. Trappe et al. (2009) mencionan que el género *Hydnotrya* se distingue por las siguientes características: ascocarpos irregulares, peridio liso o ligeramente escamoso, gleba hueca, con cámaras laberínticas y esporas elipsoides o globosas. La ornamentación de las esporas varía de espinas a verrugas, dando la apariencia de una epispora amorfa. La delimitación de especies en *Hydnotrya* ha dado lugar a reordenamientos sistemáticos en el pasado (Montecchi y Sarasini, 2000; Moser, 1963; Soehner, 1959). Por ejemplo, la especie tipo de *Hydnotrya tulasnei* (Berk.) Berk. y Broome, fue sinonimizada

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [carolina.ppaiez@gmail.com](mailto:carolina.ppaiez@gmail.com) (C. Piña-Páez).

La revisión por pares es responsabilidad de la Universidad Nacional Autónoma de México.

con *Hydnотrya carnea* (Corda) Zobel e *Hydnотrya intermedia* Buchholtz. El género *Hydnотrya* se distribuye exclusivamente en el hemisferio norte (Europa, Norteamérica y Asia). El repositorio [Index Fungorum](#) (2016) reporta 14 especies dentro del género *Hydnотrya*; sin embargo, [Trappe \(1975\)](#) menciona que tanto *H. dysodes* Kirschst. como *H. yukoensis* Gilkey son sinónimos de *H. michaelis* (E. Fisch.) Trappe, reduciendo el número de especies válidas a 12. *Hydnотrya cerebriformis* Herkn. e *Hydnотrya michaelis* están restringidas a bosques de coníferas; [Stielow et al. \(2010\)](#) mencionan que esto puede deberse a que las especies de *Hydnотrya* mantienen una asociación ectomicorrízica específica con coníferas.

## Materiales y métodos

La recolecta de ejemplares, así como el estudio macro y microscópico de los materiales, se realizaron de acuerdo con las recomendaciones de [Castellano, Trappe, Maser y Maser \(1989\)](#). Los colores del material en fresco fueron descritos en términos generales por los recolectores, los cortes se realizaron manualmente utilizando una navaja y se montaron en hidróxido de potasio (KOH) al 5% y agua para su observación al microscopio óptico. La medición de las esporas tomó en cuenta tanto el diámetro de la spora así como la altura de la ornamentación (20 esporas elegidas al azar). Además, se revisaron y compararon ejemplares de herbario depositados en la colección micológica de la Oregon State University (OSC).

Se enviaron muestras de tejido al Centro Canadiense para el Código de Barras del ADN (CCDB) para la extracción, amplificación, secuenciación y obtención de los códigos de barras de la región de los espaciadores internos transcritos (ITS). Tanto para la amplificación del ADN como para su secuenciación se usaron los iniciadores universales ITS1 e ITS4 ([White, Bruns, Lee y Taylor, 1990](#)). Las secuencias de ADN se depositaron en GenBank con los números de registro KC152118, KC152119 y KC152120. Estas fueron editadas, alineadas y analizadas filogenéticamente en Geneious 7.1 (Biomatters, Nueva Zelanda). Para realizar el análisis filogenético se descargaron de GenBank las secuencias de *Hydnотrya* de los trabajos de [Dzhagan, Alvarado y Shcherbakova \(2015\)](#) y [Stielow et al. \(2010\)](#), así como las secuencias con una similitud nucleotídica igual o mayor al 80% ([tabla 1](#)). Las secuencias se alinearon con el algoritmo de Muscle y se analizaron por máxima verosimilitud y probabilidades bayesianas posteriores. Como grupo externo se eligió a *Gyromitra infula* (Schaeff.) Quéf. ([Stielow et al., 2010](#)). En el análisis de máxima verosimilitud se usó PhyML ([Guindon et al., 2010](#)) con el modelo de sustitución GTR, analizando la topología con BEST y optimizando la topología, el largo y el radio de las ramas; para probar el soporte de las ramas usamos bootstrap (MvB) con 1,000 réplicas. En el análisis bayesiano se usó MrBayes ([Huelsenbeck y Ronquist, 2001](#)) con el radio de variación gamma, GTR como modelo de sustitución con 4 cadenas de Monte Carlo sobre 1,000,000 de generaciones submuestreando cada 400 generaciones con un valor de temperatura de 0.2; se descartaron los primeros 100,000 árboles y se calcularon las probabilidades posteriores (Bpp).

Los códigos de barras (NTECM043, NTECM175 y NTECM195) forman parte del proyecto «Neotropical Truffles», disponible a través de BOLD Systems (<http://www.boldsystems.org>). El material estudiado se encuentra depositado en los herbarios micológicos José Castillo Tovar del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria (ITCV), Herbario Nacional de México (MEXU) y la colección micológica del herbario de la Oregon State University (OSC).

## Resultados

Los análisis moleculares coincidieron con los datos morfológicos al situar las recolectas dentro del clado de *H. cerebriformis*. Tanto el análisis bayesiano ([fig. 1](#)) como el análisis de máxima verosimilitud (no incluido) colocaron las secuencias de los ejemplares mexicanos en un clado con alto nivel de soporte (Bpp=0.98, MvB=95) dentro un clado bien soportado (Bpp=1, MvB=66) que contiene todas las secuencias de *H. cerebriformis* tanto de material herborizado como de micorizas.

*Hydnотrya cerebriformis* (Tul. & C. Tul.) Harkn., Proc. Calif. Acad. Sci., Ser. 3, Bot. 1: 266 (1899) ([fig. 2a-f](#)).

Ascomas irregulares, lobulados, 10-35 × 10-20 mm, cerebriforme, con cavidades que se comunican hacia la gleba. Peridio finamente pruinoso-granuloso, de color café rojizo. Gleba con cámaras laberínticas compuestas por la invaginación y fusión de las paredes del ascocarpo, rosa claro en fresco ([fig. 2a](#)). Peridio 250-390 μm de grosor, epicutis 50-90 μm de grosor, compuesto por células capitadas, 40-60 × 14-28 μm, hialinas, paredes < 1 μm de ancho, volviéndose más pequeñas cerca del subcutis, globosas, 15-20 μm, hialinas, paredes < 1 μm de ancho ([fig. 2b](#)). Subcutis 200-300 μm de grosor, compuesto por hifas hialinas, gelatinizadas, anastomosadas, compactas a laxas, 3-5 μm en diámetro, paredes < 1 μm de ancho. Estructura himenial formada por ascas y paráfisis en un arreglo empalissado; paráfisis cilíndricas, 270-295 × 6-9 μm, con el ápice redondeado y ensanchándose de 9-18 μm de diámetro, hialinas, proyectándose por encima de las ascas hasta 120 μm, formando un epitacio a lo largo del himenio en grupos, paredes < 1 μm de ancho ([fig. 2c](#)); ascas cilíndricas, 175-200 × 25-35 μm, hialinas, paredes < 1 μm de ancho, octosporadas, uniseriadas ([fig. 2d](#)). Ascosporas globosas de 20-25 μm de diámetro ( $\bar{x}$ =22.85 μm), excluyendo la ornamentación, de color café en KOH ([fig. 2e](#)) a café ámbar en esporas maduras ([fig. 2f](#)); paredes ± 1 μm de ancho. Ornamentación finamente verrugosa, verrugas de hasta 4 μm de longitud.

## Resumen taxonómico

Estado de México: La puerta, camino Toluca-Temascaltepec, Parque Nacional Nevado de Toluca, 19°11'23.92" N, 99°49'11.96" O, 3,100 m snm, en bosques de *Abies religiosa* Lindl., hipogeo, gregario, 19 de septiembre de 2009, col. G. Guevara (GG1080, GG1082). Nuevo León: Cerro del Potosí, Galeana, en bosque mixto de *Pinus hartwegii* Lindl., *Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schltdl., *Abies vejarii* Martínez,

Tabla 1  
Secuencias usadas en el análisis filogenético de *Hydnotrya cerebriformis*.

Taxones	Núm. acceso	% id	Valor e	País	Hospedero
<i>Gyromitra infula</i>	KC152109	79.1	1.3e-118	México	
<i>Gyromitra infula</i>	KC152110	78.7	6.6e-116	México	
<i>H. bailii</i>	AM261522	81.8	0	República Checa	
<i>H. bailii</i>	GQ140237	80.7	5.1e-168	Alemania	<i>Picea abies</i>
<i>H. bailii</i>	GQ140239	80.6	1.8e-167	Alemania	<i>Picea abies</i>
<i>H. bailii</i>	GQ149464	81.6	0		
<i>H. bailii</i>	KC893558	81.2	8.6e-178	Ucrania	
<i>H. cerebriformis</i>	GQ140234	98.5	0	Alemania	<i>Picea abies</i>
<i>H. cerebriformis</i>	JF908765	98.1	0	Alemania	
<i>H. cerebriformis</i>	KC152120*	99.9	0	México: Tlaxcala, La Malinche	
<i>H. cerebriformis</i>	KC152118*	100	0	México: Puebla, Pico de Orizaba	
<i>H. cerebriformis</i>	KC152119*	99.9	0	México: Puebla, Izta-Popo	
<i>H. cubispora</i>	EU784273	80.4	9.8e-171		
<i>Hydnotrya</i> sp. B278	FN669207	81.8	0	Estonia	
<i>Hydnotrya</i> sp. GB397	JN102492	82.4	0	EUA	
<i>Hydnotrya</i> sp. LB-Ht	AJ969616	81.2	0	Dinamarca	<i>Fagus sylvatica</i>
<i>Hydnotrya</i> sp. LM4711	KM576389	81.6	0	España	<i>Quercus petraea</i>
<i>H. tulasnei</i>	AJ969621	81.1	0	Dinamarca	
<i>H. tulasnei</i>	EU784276	79.5	1.9e-154		
<i>H. tulasnei</i>	GQ140240	80.3	9.1e-165	Alemania	<i>Fagus sylvatica</i>
<i>H. tulasnei</i>	GQ149457	81.2	0		<i>Fagus sylvatica</i>
<i>H. tulasnei</i>	GQ149460	81.4	0		<i>Fagus sylvatica</i>
<i>H. tulasnei</i>	GQ149461	81.4	0		<i>Fagus sylvatica</i>
<i>H. tulasnei</i>	GQ215698	81.4	0		<i>Pinus sylvestris</i>
<i>H. tulasnei</i>	HM189757	81.2	0		<i>Fagus sylvatica</i>
<i>H. tulasnei</i>	HM189758	81.5	0		<i>Fagus sylvatica</i>
<i>H. tulasnei</i>	HM189759	81.4	0		<i>Fagus sylvatica</i>
<i>H. tulasnei</i>	HM189763	81.4	0		<i>Fagus sylvatica</i>
<i>H. tulasnei</i>	HM189764	81.3	0		<i>Fagus sylvatica</i>
Micorriza	HM044591	98.2	0	Italia	<i>Pinus cembra</i>
Micorriza	JN570502	98.1	0	Italia	
Micorriza	KF041348	98.1	0	México: Estado de México	<i>Abies religiosa</i>
Micorriza	KJ195382	98.0	0	República Checa	<i>Picea abies</i>
Micorriza	KJ195384	98.3	0	República Checa	<i>Picea abies</i>
Micorriza	KJ195385	98.0	0	República Checa	<i>Picea abies</i>
Micorriza	KJ195386	98.3	0	República Checa	<i>Picea abies</i>
Micorriza	KJ195387	97.9	0	República Checa	<i>Picea abies</i>

Núm. acceso: en GenBank; valor e: probabilidad de error en el alineamiento de las secuencias; % id: porcentaje de similitud nucleotídicas.

\* Las secuencias con un asterisco se generaron en este trabajo.

*Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Beissn.) Franco, *Populus tremuloides* Michx., hipogeo, gregario, 6 de septiembre de 1985, col. J.G. Marmolejo (OSC 150001, 150002). Puebla: Parque Nacional Izta-Popo Zoquiapan, San Nicolás de los Ranchos, 19.11° N, 98.59° O, 3,364 m snm, en bosque de *Pinus montezumae* Lamb., hipogeo, 5 de septiembre de 2009, col. R. Garibay-Orijel GO-2009-242 (MEXU 26188), número de acceso de GenBank KC152119, número de acceso de Bold Systems NTECM043. Parque Nacional volcán Pico de Orizaba, Chalchicomula de Sesma, 19.00° N, 97.32° O, 3,282 m snm, en bosque de *P. hartwegii* y zacatonal, hipogeo, solitario, 18 de octubre de 2009, col. R. Garibay-Orijel GO-2009-455 (MEXU 26498), número de acceso de GenBank KC152118, número de acceso de Bold Systems NTECM175; Estación forestal, Zoquiapan, 7 de octubre 1985, col. J. Trappe (OSC 150000). Tlaxcala: Cañada central, Parque Nacional Volcán La Malinche, Huamantla, 19°29'08.40" N, 98°00'21.60" O, 3,200 m snm, en bosque de *A. religiosa*, *Pinus pseudostrobus* Lindl. y *Salix paradoxa* Kunth y C.K.Schneid., hipogeo,

gregario, septiembre 2007, col. M.E. Smith (OSC 150003, 150004). Parque Nacional Volcán La Malinche, Huamantla, 19.24° N, 98.03° O, 3,997 m snm, en bosque de *P. hartwegii* y zacatonal, hipogeo, gregario, 29 de agosto de 2010, col. Roberto Garibay Orijel GO-2010-097 (MEXU 26518), número de acceso de GenBank KC152120, número de acceso de Bold Systems NTECM195.

#### Comentarios taxonómicos

Harkness (1899) describió por primera vez *H. cerebriformis* de la siguiente manera: «Large, 3 cm. in diam., color salmon, subrotund, smooth, brain-like markings upon the surface; gleba white or faintly citron, canals gyrose; hymenium covered with clavate villi between and extending beyond the asci; asci cylindrical, briefly stipitate; spores globose, brown, foveolate, 25 μ in diam.». Los ejemplares estudiados concuerdan con la descripción anterior; sin embargo, las dimensiones de las esporas son acordes a las de Gilkey (1939), quien revisó el material

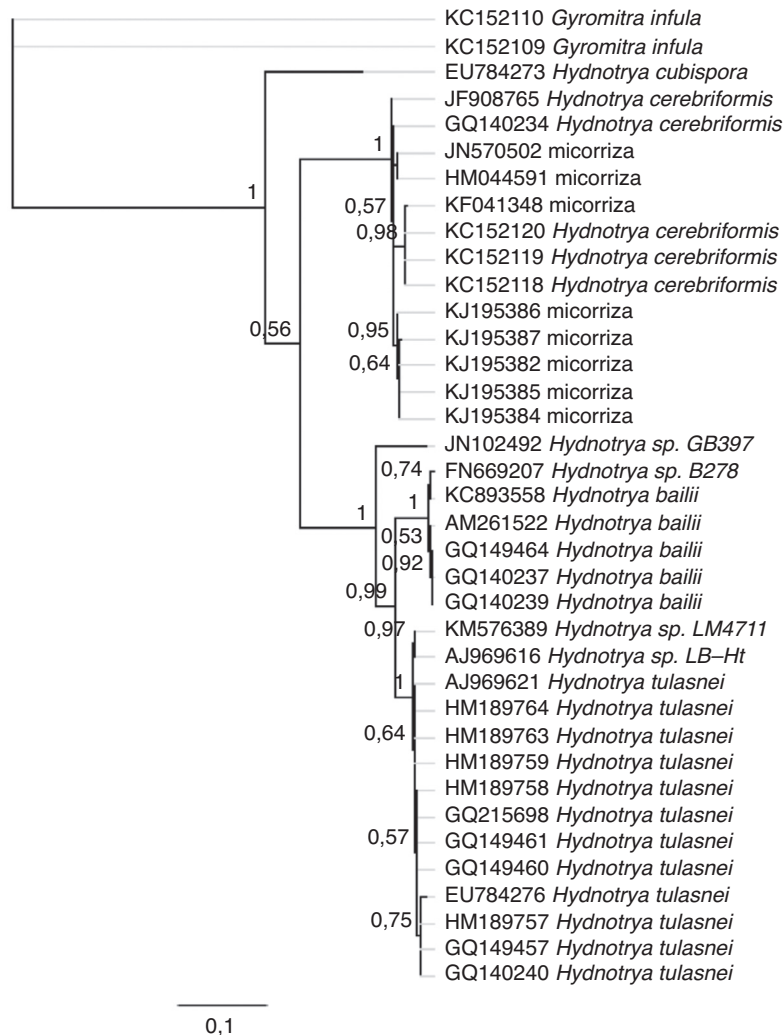


Figura 1. Análisis filogenético de *Hydnотrya cerebriformis* realizado por medio de inferencia bayesiana con el modelo de sustitución de nucleótidos GTR. La barra representa el número de sustituciones por base. En cada nodo se muestran sus probabilidades posteriores después de 1,000,000 de generaciones de árboles. Las etiquetas de las ramas indican el número de acceso de la secuencia en GenBank y su identidad taxonómica.

tipo de esta especie. Gilkey (1939) probablemente incluyó la ornamentación en la medida de las esporas (25–32  $\mu\text{m}$ ).

Esta especie se caracteriza por tener esporas globosas con una corona de verrugas distintiva, 3–4  $\mu\text{m}$  de altura, embebidas en una matriz amorfa, de color café en KOH y en agua, de aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  de diámetro. *Hydnотrya cerebriformis* se distingue de *H. tulasnei* por la ornamentación de la espora, ya que la segunda posee una episporio amorfo que al madurar forma verrugas. Cabe mencionar que *Hydnотrya* sp. ha sido citada para Tlaxcala, México, por Uribe-Arróyave (1998) en una tesis de licenciatura; sin embargo, ninguna especie del género ha sido descrita oficialmente en alguna revista científica. Primer registro del género para México.

## Discusión

*Hydnотrya cerebriformis* ha sido citada de Norteamérica, Europa y Asia asociada a bosques de coníferas (Stielow et al., 2010) y vegetación riparia. Las secuencias de ADN de esta especie provienen principalmente de Alemania, República Checa e

Italia, en donde forma micorrizas con *Picea abies* (L.) H.Karst. y *Pinus cembra* L. (tabla 1). En México ha sido recolectada principalmente en el Eje Neovolcánico Transmexicano y en el estado de Nuevo León en altitudes que van desde los 3,100 a los 4,000 m snm. En estas zonas se asocia a bosques de coníferas, principalmente de *A. religiosa*, *Pinus montezumae* y *P. hartwegii*, hasta el límite de la vegetación en la montañas más altas del centro de México. Dentro del clado de los ejemplares mexicanos también se encuentra una secuencia ambiental (KF041348) (fig. 1) que presenta una similitud nucleotídica del 99.23% con los ejemplares de herbario y proviene de una micorriza de *A. religiosa* de bosques del Estado de México (Argüelles-Moyao et al., en prensa). Lo que indica que *H. cerebriformis* es recolectada frecuentemente en este tipo de bosques, ya que se halla asociada a las raíces de *A. religiosa*.

Si bien este trabajo contribuye al conocimiento sobre la taxonomía, distribución y biología de *H. cerebriformis*, consideramos que es necesario seguir realizando trabajos sobre este género, ya que es un taxón relativamente pequeño pero de importancia ecológica y gran relevancia al encontrarse asociada

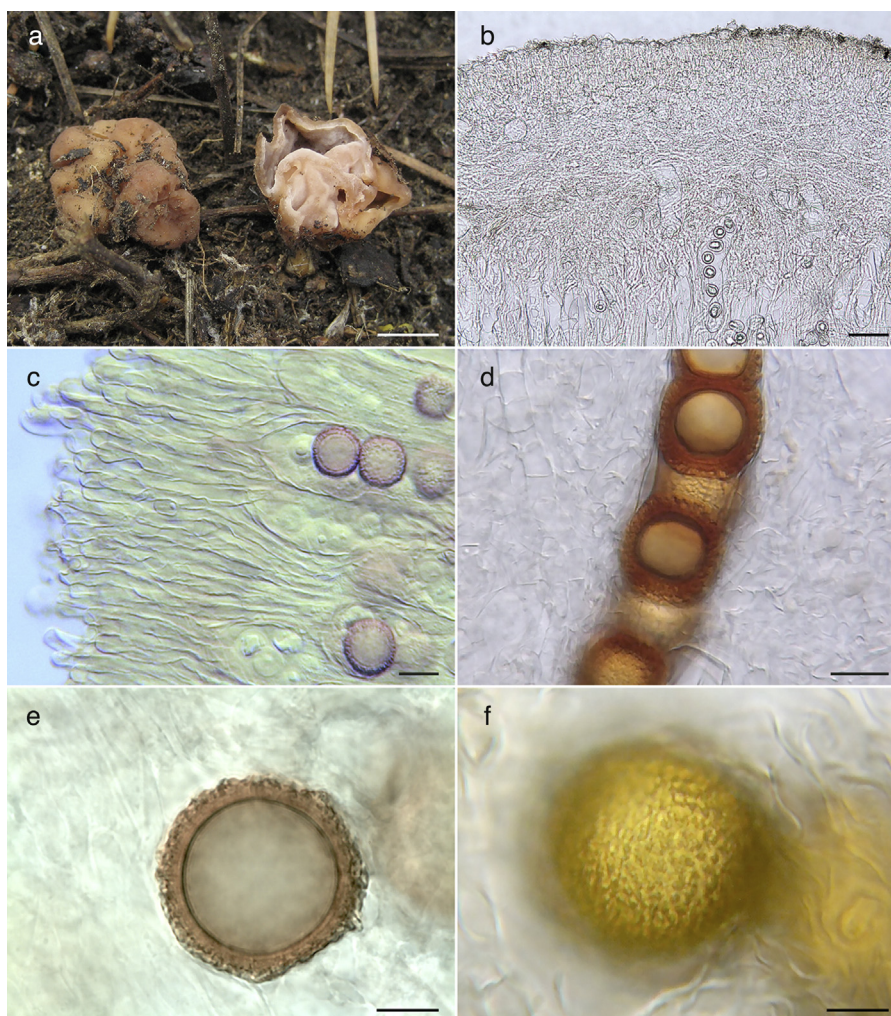


Figura 2. Características macro y microscópicas de *Hydnotrya cerebriformis*. a) ascomas MEXU (26498); b) sección transversal del peridio (MEXU 26498); c) paráfisis (MEXU 26498); d) esporas en ascas, con microscopía Nomarski (OSC 150003); e) espóra mostrando la ornamentación, corte transversal (MEXU 26498); f) superficie de la espóra, con microscopía Nomarski (MEXU 26498). Barras de escala: a = 5 mm, b = 50  $\mu\text{m}$ , c = 22  $\mu\text{m}$ , d = 15  $\mu\text{m}$ , e y f = 10  $\mu\text{m}$ .

con árboles de alta montaña cuyo hábitat está amenazado por el calentamiento global. Adicionalmente, ya que solo algunas de sus especies presentan escasa variación morfológica, sería importante ampliar los análisis filogenéticos, donde se incluyan todas las especies del género, mayor número de marcadores moleculares y una amplia representación geográfica.

### Agradecimientos

Agradecemos a la maestra Celia Elvira Aguirre Acosta, Eduardo Hernández-Navarro y Nohelia Guadalupe Pacheco Hoyos por su apoyo técnico. Gracias a Edith Hernández, Lucía Yelania Velasco, Mario Domínguez Gutiérrez, Mariana García Guzmán, Rodolfo Ángeles Argáiz por su apoyo en el trabajo de campo. La recolecta de los ejemplares fue financiada por el proyecto UCMEXUS-Conacyt 491. La secuenciación de los códigos de barras fue financiada por la red MEXBOL proyecto Conacyt 194045. Se agradece a los revisores por los comentarios y sugerencias.

### Referencias

- Argüelles-Moyao, A., Garibay-Orijel, R., Márquez-Valdelamar, L. M. y Arellano-Torres, E. (en prensa). *Clavulina-Membranomyces* is the most important lineage within the high diversity ectomycorrhizal fungal community of *Abies religiosa*. *Mycorrhiza*.
- Castellano, M. A., Trappe, J. M., Maser, Z. y Maser, C. (1989). *Keys to spores of the genera of hypogeous fungi of north temperate forests with special reference to animal mycophagy*. Eureka, California: Mad River Press.
- Dzhagan, V., Alvarado, P. y Shcherbakova, Y. (2015). *Hydnotrya bailii* Soehner (Ascomycota, Pezizales), a new hypogeous fungus for the Ukraine. *Nova Hedwigia*, 100, 259–263.
- Gilkey, H. (1939). Tuberales of North America. Oregon State. *Monograph Studies in Botany*, 1, 1–63.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. y Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59, 307–321.
- Harkness, H. W. (1899). Californian hypogeous fungi. *Proceedings of the California Academy of Science*, 3, 241–292.
- Huelsenbeck, J. P. y Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754–755.
- Index Fungorum [consultado 26 Jul 2016]. Disponible en: <http://www.indexfungorum.org>

- Montecchi, A. y Sarasini, M. (2000). *Fungi ipogei d'Europa*. Vicenza: Associazione Micologica Bresadola, Fondazione Centro Studi Micologici.
- Moser, M. (1963). *Ascomyceten (Schlauchpilze) Band IIa*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Soehner, E. (1959). Tuberaeen studien V, Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung, Munich.
- Stielow, B., Bubner, B., Hensel, G., Münzenberger, B., Hoffmann, P., Klenk, H. P., et al. (2010). The neglected hypogeous fungus *Hydnotrya bailii* Soehner (1959) is a widespread sister taxon of *Hydnotrya tulasnei* (Berk.) Berk. & Broome (1846). *Mycological Progress*, 9, 195–203.
- Trappe, J. M. (1975). Generic synonyms in the Tuberales. *Mycotaxon*, 2, 109–122.
- Trappe, J. M., Molina, R., Luoma, D. L., Cázares, E., Pilz, D., Smith, J. E., et al. (2009). *Diversity, ecology, and conservation of truffle Fungi in forests of the Pacific Northwest*. Portland: Pacific Northwest Research Station, General Technical Report.
- Uribe-Arróyave, I. E. (1998). *Contribución al conocimiento de los hongos hipogeos del estado de Tlaxcala, México (tesis)*. México, D.F.: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, y T. J. White (Eds.), *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. New York: Academic Press.