

## 白山高山帯で新たに発見されたホコリヤグラタケ (*Collybia cirrata*)

糟谷大河 千葉科学大学危機管理学部環境危機管理学科  
保坂健太郎 国立科学博物館植物研究部  
梶典雅 石川県白山自然保護センター

### A new record of *Collybia cirrata* in the alpine zone of Mt. Hakusan, central Japan

Taiga KASUYA, *Department of Environmental Risk and Crisis Management, Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science*

Kentaro HOSAKA, *Department of Botany, National Museum of Nature and Science*

Norimasa TOGA, *Hakusan Nature Conservation Center, Ishikawa*

#### はじめに

石川きのこ会では、環境省ほか関係行政機関および土地所有者による許可の下、白山の高山帯から亜高山帯にかけての菌類相、特にきのこ相の調査を1992年より継続している(梶ら, 1998)。2012年9月に行われた石川きのこ会によるこの調査の中で、白山高山帯のハイマツ群落の周囲において、担子菌門ハラタケ目キシメジ科に属するヤグラタケモドキ属 *Collybia* (Fr.) Staude の一種のきのこが採集された。ヤグラタケモドキ属は北半球温帯以北に広く分布し、これまでに3種が知られている小規模な分類群である(Kasuya and Sato, 2009)。本属は形態的・生態的に、微小～小型の子実体を形成する点、かさの表皮組織が平行菌糸被で、幅の狭い円筒形の平滑菌糸からなり、凝着型色素を欠く点、柄の基部にしばしば菌核を形成する点、さらに担子菌類の朽ちた子実体上にしばしば発生する点により特徴づけられる(Antonín and Noordeloos, 1997)。本属菌は、日本ではこれまでにタマツキカレハタケ *C. cookei* (Bres.) J.D. Arnold、ヤグラタケモドキ *C. tuberosa* (Bull.) P. Kumm. およびホコリヤグラタケ *C. cirrata* (Schumach.) Quél. の3種が報告されている(Kasuya and Sato, 2009)。筆者らは、白山高山帯において採集されたヤグラタケモドキ属菌について、形態的特徴の観察および分子系統解析を行った結果、本菌をホコリヤグラタケと同定した。本種は、日本ではKasuya and Sato (2009) により北海道上川郡上川

町の大雪山旭岳に分布することが報告されているが、Kasuya and Sato (2009) 以降、大雪山旭岳以外の地域からの記録はない。本種は世界的に、北半球北部の冷温帯以北、特に高山帯や極地に分布し、ユーラシア大陸から北アメリカ大陸の北極を中心とする地域に産することから、周極分布を示すと考えられている(Hughes and Petersen, 2006; Kasuya and Sato, 2009)。このため、日本での本種の分布も冷温帯以北の高山帯などの地域に限られることが推測される。しかし、日本では高山帯の菌類相の調査が進んでいないこともあり、本種の詳しい分布状況は明らかとなっておらず、本州からの報告例はこれまでにない。そこで、ここに白山産ホコリヤグラタケの子実体の形態的特徴および発生環境について報告する。

ところで、本種が含まれるヤグラタケモドキ属菌については、これまでに詳細な分子系統学的研究が行われている(Hughes et al., 2001; Hughes and Petersen, 2006)。ヤグラタケモドキ属内におけるホコリヤグラタケの系統的位置もすでに明らかとなっているが(Hughes and Petersen, 2006)、日本産標本を用いた分子系統解析は行われておらず、日本産標本の系統的位置は明確になっていなかった。そこで筆者らは、白山で採集されたホコリヤグラタケの標本を用いて分子系統解析を試みた。本報告ではその系統的位置および系統地理学的特徴についても考察する。

## 材料および方法

野外で採集した子実体は、食品用乾燥機 (Snackmaster Express FD-61, Nesco/American Harvest, WI, USA) を用いて46℃で36時間熱乾燥させ、乾燥標本を作製した。乾燥標本に加えて、Hosaka and Castellano (2008), Hosaka et al. (2010), Kasuya et al. (2012) の方法に従い、新鮮な生の子実体から剃刀の刃を用いてひだの一部を切り取り、100 mM Tris-HCl (pH 8.0) および0.1 M 亜硫酸ナトリウム (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) を添加したDMSOバッファー (Seutin et al. 1991) 中に浸漬し、4℃で保存した。供試標本は国立科学博物館植物研究部の菌類標本庫 (TNS) に保管した。

子実体の肉眼的特徴は新鮮な生の子実体に基づき観察した。光学顕微鏡観察には乾燥標本を用い、子実体のひだの切片を作成し、それらを水酸化カリウ

ム (KOH) 3% (w/v) 水溶液およびメルツァー試薬を用いて観察した。担子胞子の大きさは、光学顕微鏡の1000倍の倍率下で無作為に抽出した40個を用いて測定した。

子実体からのDNA抽出は、DMSOバッファー中に浸漬した試料を用いて行った。DNA抽出は、グラスミルクを用いた改変CTAB抽出法 (Hosaka, 2009; Hosaka and Castellano, 2008; 糟谷ら, 2013) により行った。得られたDNAを鋳型とし、PCRにより核rDNA遺伝子の転写領域内部スペーサー (ITS) 領域および核rDNA遺伝子のサブユニット (LSU) を増幅した。ITS領域の増幅にはITS5とITS4 (White et al., 1990), LSUの増幅にはLR0RとLR5 (Vilgalys and Hester, 1990) のプライマーセットをそれぞれ用いた。PCRは、反応液を20 μl [1 μlの精製DNA, 1 μlのdNTP (4 mM), 1 μlの各プライマー (8 μl), 0.5 unitsのTaqポリメラーゼ (タカラバイオ, 大津), 2

Table 1. Sequence data used for the present phylogenetic analyses. The dataset consisted of sequence data obtained from the present study and from NCBI GenBank.

Species	Collection no.	Origin	GenBank accession no.	
			ITS	LSU
<i>Collybia cirrata</i>	TNS-F-61697	Japan, Ishikawa, Mt. Hakusan	KP293582	KP293584
<i>C. cirrata</i>	TENN 59591	Russia, Novgord	DQ830804	-
<i>C. cirrata</i>	TENN 59595	Russia, Novgord	DQ830805	-
<i>C. cirrata</i>	TENN 53599	Finland, Etelä-Häme	AF274381	-
<i>C. cirrata</i>	TENN 58677	Greenland, Kangerlussuaq	AF361314	-
<i>C. cirrata</i>	TENN 53540	Sweden, Uppland	-	AF261387
<i>C. cirrata</i>	TENN 50621	Switzerland, Maggia	AF361313	-
<i>C. cirrata</i>	TENN 53961	USA, Alaska	AF361318	-
<i>C. cookei</i>	CBS 450.86	Belgium	AF274383	-
<i>C. cookei</i>	GLM 45891	Germany	-	AY207165
<i>C. cookei</i>	TENN 54154	Russia, Caucasus	AF361305	-
<i>C. cookei</i>	TENN 49324	Russia, Primorsk	AF361306	-
<i>C. cookei</i>	TENN 55143	Mexico, Tlaxcala	-	AF261388
<i>C. tuberosa</i>	TENN 53630	Sweden, Uppland	AY854072	AF261386
<i>C. tuberosa</i>	DAOM 191061	Canada, Newfoundland	AF274376	-
<i>C. tuberosa</i>	DUKE 1424	USA, Montana	-	AF261384
<i>C. tuberosa</i>	DUKE 1809	USA, Varginia	AF274378	-
<i>Clitocybe connata</i>	Lc 023	China	HM119487	-
<i>C. dealbata</i>	GLM 45879	Germany	-	AY207152
<i>C. dealbata</i>	MCVE 11212	Italy	JF907804	-
<i>Lepista sordida</i>	GLM 45949	Germany	-	AY207225
<i>L. sordida</i>	TNS-F-61698	Japan, Chiba, Sakura	KP293583	-

$\mu\text{l}$ の $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 2  $\mu\text{l}$ のBovine Serum Albumin (BSA)] とし, 以下の温度プログラムにより行った: 前処理, 94°C 3分を1サイクル; 熱変性, 94°C 35秒, アニーリング, 51°C 30秒, 伸長, 72°C 1分を30サイクル; 後処理, 72°C 10分を1サイクル。

PCR産物は1%アガロースゲルで電気泳動した後, エチジウムブロマイドにより染色し, 紫外線照射により可視化させた。これにより遺伝子の増幅が確認された場合, PCR産物をillustra ExoStar (GE Healthcare, UK) を用いて精製し, Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., Norwalk, CT, USA) により定法に従ってダイレクトシーケンスを行い, 塩基配列を決定した。以上により得られた白山産ホコリヤグラタケの塩基配列をNCBI GenBankに登録した (ITS領域: KP293582; LSU: KP293584)。

本研究により新たに得られた塩基配列はATGC Ver. 6 (GENETYX, 東京) でアセンブルした。その後, ITS領域とLSUについてそれぞれ, GenBank上に公開されているホコリヤグラタケを含むハラタケ型きのこ類の塩基配列を加えて系統解析を行った。データセット (Table 1) はMuscle v3.6 (Edgar, 2004a, b) によりアライメントを行い, さらにBioEdit ver. 7.0.1 (Hall, 1999) を用いてその結果を目視で確認し, 必要に応じて補正した。その後, PAUP\* ver. 4.0b10 (Swofford, 2002) を用いて最節約法により系統樹を作成した。最節約系統樹の探索にはMULTREESオプションを用いて発見的探索法を, また, 初期系統樹の作製にはrandom additionオプションを用いて1,000回反復を行った。すべてのキャラクターはunorderedおよびequal weightとした。枝の位置交換はtree-bisection-reconnection (TBR) に設定した。また, 総体一致指数 (consistency index = CI), 保持指数 (retention index = RI), 修正一致指数 (rescale consistency index = RC) についても求めた。さらに, 最節約法により得られた系統樹の各枝の支持率には, ブートストラップ解析を10,000回反復して行った。なお, 外群にはホコリヤグラタケと同じくキシメジ科に属するコムラサキシメジ *Lepista sordida* (Schumach.) Singerを用いた (Table 1)。

### 結果および考察

*Collybia cirrata* (Schumach.) Quél., Mém. Soc. Émul. Montbéliard Sér. 2, 5: 96, 1872, as "*cirrhatius*". (Figs.

1-2)

和名: ホコリヤグラタケ (Kasuya and Sato, 2009)

かさ (Fig. 1D) は直径1-13 mm, 丸山形からのち中高の平らに開く; 表面は湿時, クリーム色から淡灰色で, 中央部はやや濃色, 乾燥すると淡色となり, 鈍い光沢を呈する; 全体がほぼ平滑で無毛, 縁部にはわずかに放射状の溝線を有し, 湿時やや粘性がある。ひだ (Fig. 1B-C) は密, 薄く, 直生~わずかに垂生, 白色からクリーム色。柄 (Fig. 1C) は3-14×1-1.5 mm, 円筒形, 表面は微粉状, 頂部は白色から淡色で, 基部に向かうにつれて淡褐色から淡赤褐色, 基部に白色の綿毛状の菌糸塊を有し, 基質に付着する。菌核を欠く。肉は非常に薄く, 白色, 特別な味やにおいはない。胞子紋は白色。

担子胞子 (Fig. 2A) は4.5-5.5×2-3  $\mu\text{m}$ , 楕円形~円筒形, 厚壁, 透明, 非アミロイド, 表面は平滑。担子器は15-22×3.5-5.5  $\mu\text{m}$ , こん棒形, 4胞子性。ひだ実質は類並列型, 菌糸は薄壁で透明, 円筒形で幅4-8  $\mu\text{m}$ 。縁シスチジアおよび側シスチジアを欠く。かさ表皮 (Fig. 2B) は平行菌糸被, 粘質性で薄壁, 透明または淡黄色を帯び, 円筒形で幅5-6.5  $\mu\text{m}$ の平滑菌糸からなり, 時に厚さ10-30  $\mu\text{m}$ のゼラチン質で透明な不定形の塊が入り込む。菌糸にはクランプが豊富に存在する。

供試標本: 石川県白山市白山室堂平 (Fig. 1A), ハイマツ群落周囲の地上に発生した, ハラタケ型きのこ類のミイラ化した子実体に少数が群生 (Fig. 1B), 2012年9月1日, 糟谷大河採集, TNS-F-61697. Specimen examined: Japan, Ishikawa Pref., Hakusan-shi, Mt. Hakusan, Murodo-daira, ca 2,500 m alt. (Fig. 1A), on the mummified basidioma of unidentified agaric mushroom (Fig. 1B), near the community of *Pinus pumila*, September 1, 2012, coll. T. Kasuya, TNS-F-61697.

本種は形態的に, 柄が総状分岐せず, その基部は根状に長く伸長しない点, さらに菌核を欠く点により特徴づけられる (Kasuya and Sato, 2009)。白山産標本の形態的特徴は, これまでのホコリヤグラタケの記載 (Lennox, 1979; Antonín and Noordeloos, 1997; Hughes et al., 2001; Hughes and Petersen, 2006; Kasuya and Sato, 2009) とよく一致していた。このため, 筆者らは白山産標本をホコリヤグラタケと同定した。日本に広く分布するヤグラタケモドキ属菌であるタマツキカレハタケとヤグラタケモドキは,

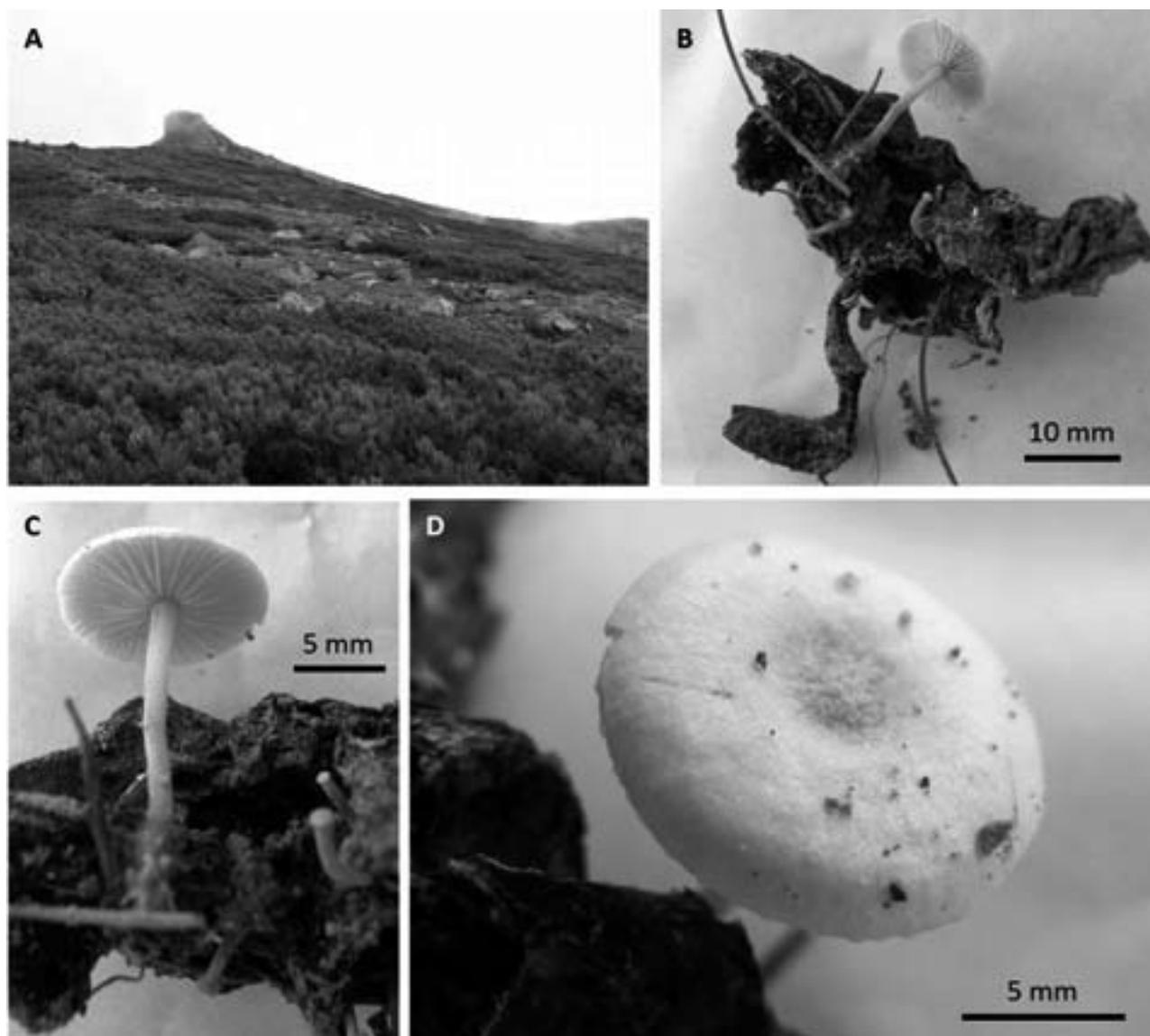


Fig. 1. Habitat and macromorphological features of *Collybia cirrata* collected on Mt. Hakusan (TNS-F-61697). A: Habitat with *Pinus pumila* in Murodo-daira. B: Basidiomata on the unidentified, mummified agaric mushroom. C: Lamellae and stipe of a mature basidioma. D: Pileus of a mature basidioma.

本種と形態的・生態的に類似するが、これら2種は柄の基部に菌核を形成する (Lennox, 1979; Antonín and Noordeloos, 1997; Hughes et al., 2001; Hughes and Petersen, 2006) ことから、ホコリヤグラタケとは明らかに異なる種であると区別できる。

ホコリヤグラタケは、これまでヨーロッパ (Antonín and Noordeloos, 1997)、グリーンランド (Hughes and Petersen, 2006)、シベリア (Hughes and Petersen, 2006)、日本 (Kasuya and Sato, 2009)、北アメリカ (Lennox, 1979) から報告されており、北半球温帯以北に広く分布する種であると考えられる。本種は、日本ではKasuya and Sato (2009) によ

り、北海道産の標本に基づき日本新産種として報告された。国内では本種はこれまで北海道のみから記録されており (Kasuya and Sato, 2009)、本報告は本州における本種の初の分布記録である。

本種の子実体は担子菌類の朽ちた子実体上に発生し、これまでにチチタケ属 *Lactarius* Pers. やベニタケ属 *Russula* Pers. のほか、トンビマイタケ *Meripilus giganteus* (Pers.) P. Karst. やチビホコリタケ *Bovista dermoxantha* (Vittad.) De Toni など、多様なきのこ類の子実体から発生することが知られている (Hughes and Petersen, 2006; Kasuya and Sato, 2009)。供試標本は、ミイラ化したハラタケ型きのこ類の子実体上

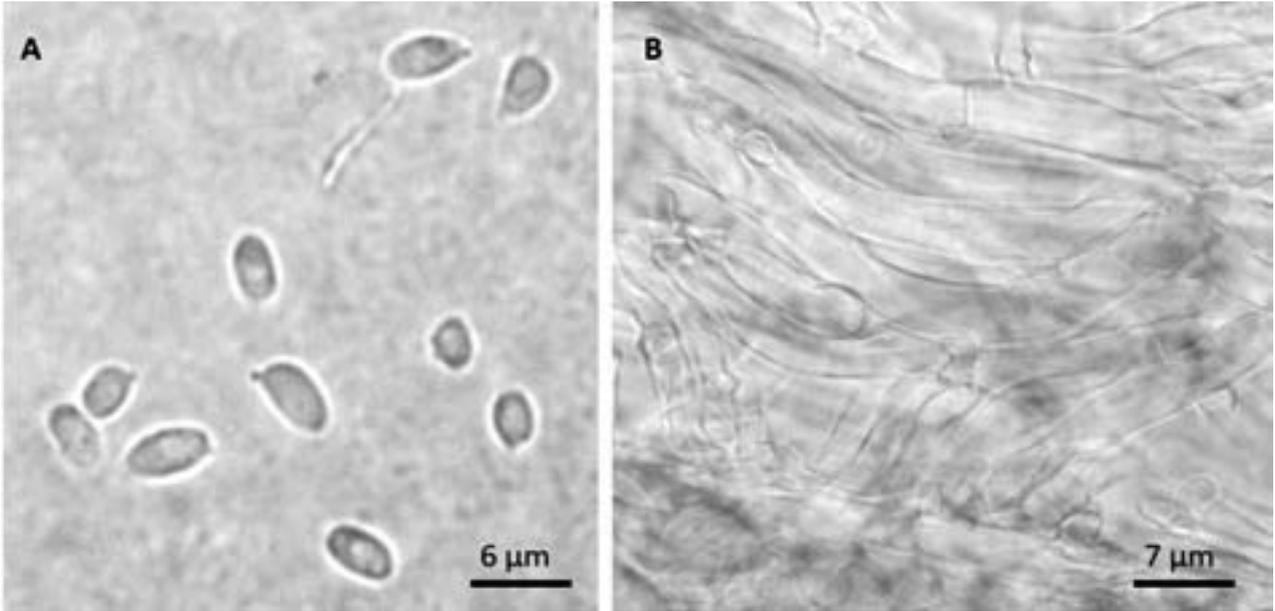


Fig. 2. Microscopic features of *Collybia cirrata* (TNS-F-61697). A: Basidiospores. B: Pilleipelis.

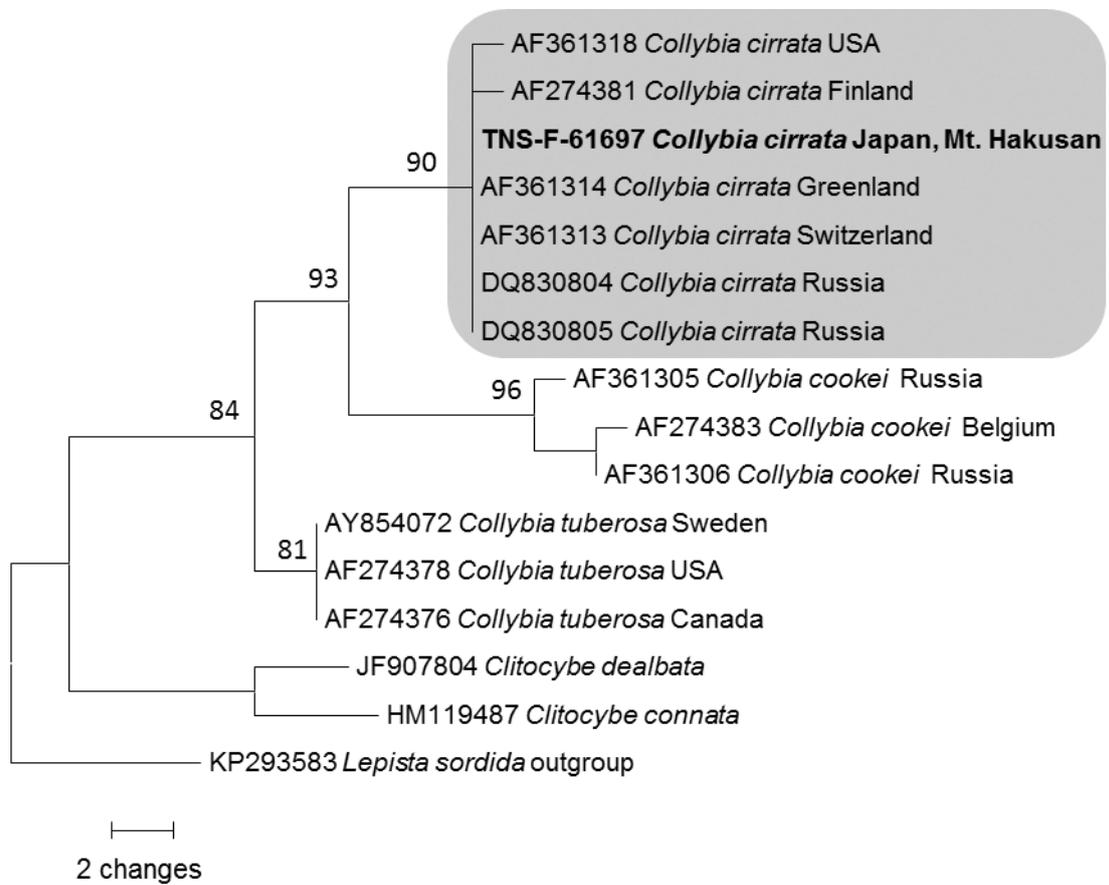


Fig. 3. One of four parsimonious trees of *C. cirrata* derived by the maximum parsimony analysis of the nuclear rDNA ITS region. The numbers along the branches are the nodal supports (parsimony bootstrap values).

に発生していた (Fig. 1B) が、宿主の子実体は腐敗して黒く変色し、かつ乾燥しており、宿主の種を同定することはできなかった。

本研究により新たに得られた白山産ホコリヤグラタケのITS領域とLSUの塩基配列をBLAST (Altschul et al., 1997) により相同性検索を行った結果、ITS領域はロシア (DQ830804, DQ830805)、ヨーロッパ (AF274381, AF361313)、グリーンランド (AF361314) およびアメリカ合衆国 (AF361318) 産ホコリヤグラタケの塩基配列とそれぞれ99%の相同性を示した。また、LSUについても同様にヨーロッパ産ホコリヤグラタケの塩基配列 (AF261387) と99%の相同性を示した。これらの結果から、白山産標本はホコリヤグラタケであることが分子同定によっても支持された。

白山産ホコリヤグラタケを含むキシメジ科菌類のITS領域を用いて最節約法による系統解析を行った結果、664サイトから構成されるITS領域の部分配列のうち31サイトに変異があり、それらは最節約法における系統学上、有用な情報であった。PAUP\* ver. 4.0b10を用いた最節約法による解析では、993ステップからなる4個の系統樹が得られた (CI = 0.7292, RI = 0.8312, RC = 0.6061)。この解析の結果、日本 (白山)、ロシア、ヨーロッパ、グリーンランドおよびアメリカ合衆国産のホコリヤグラタケは同一のクレードを形成し、単系統群をなすことが明らかとなった (Fig. 3)。また、このクレードの単系統性は最節約法の高いブートストラップ値により支持

された (Fig. 3)。

さらに、同様に白山産ホコリヤグラタケを含むキシメジ科菌類のLSUを用いて最節約法による解析を行った結果、904サイトから構成されるLSUの部分配列のうち12サイトに変異があり、それらは最節約法における系統学上、有用な情報であった。PAUP\* ver. 4.0b10を用いた最節約法による解析では、996ステップからなる6個の系統樹が得られた (CI = 0.8000, RI = 0.8500, RC = 0.6800)。この解析の結果、日本 (白山) およびヨーロッパ産のホコリヤグラタケは同一のクレードを形成し、単系統群をなした (Fig. 4)。また、このクレードの単系統性は最節約法のブートストラップ値で強く支持された (Fig. 4)。

以上のITS領域とLSUの解析結果から、日本 (白山)、ユーラシア大陸、グリーンランドおよび北アメリカ大陸のホコリヤグラタケは単系統であり (Figs. 3-4)、これらの中で地理的な分布パターンは認められなかった。また、これらの地域で得られたホコリヤグラタケにおいて、ITS領域とLSUの塩基配列の相同性はきわめて高かったことから、本種ではこれらの遺伝子領域の保存性が高いことが示唆される。同時にこのことから、ホコリヤグラタケにおいては北半球温帯以北での長距離分散が頻繁に起こっており、広大な範囲で遺伝子流動が生じていることが推察される。なお本研究では、前述した本種の北海道産標本 (Kasuya and Sato, 2009) からは、塩基配列を得ることができなかった。今後、日本の白山以外の地域からも本種の標本を収集し、日本で

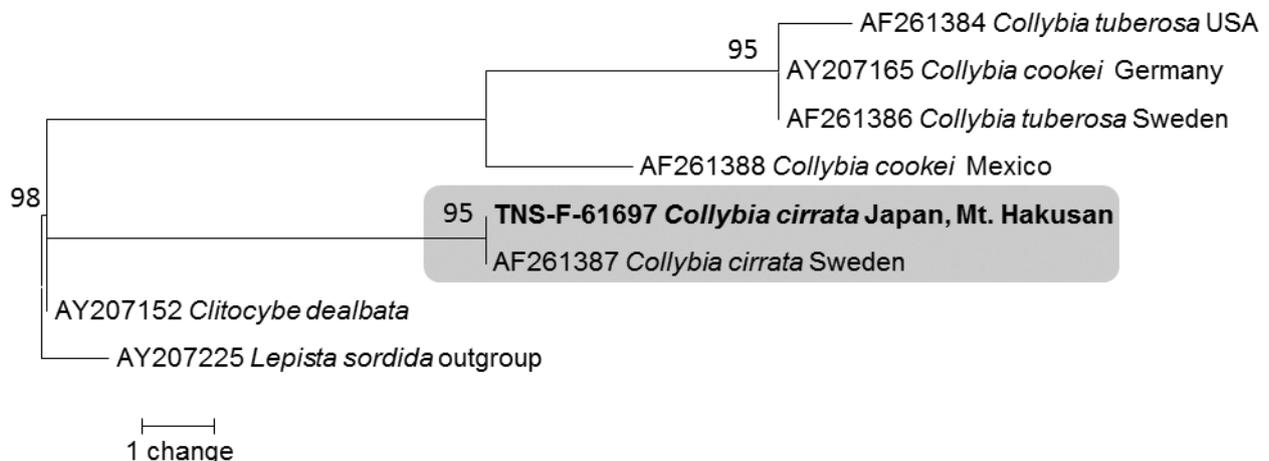


Fig. 4. One of six parsimonious trees of *C. cirrata* derived by the maximum parsimony analysis of the nuclear rDNA large subunit gene. The numbers along the branches are the nodal supports (parsimony bootstrap values).

の本種の分布をより詳細に把握していくとともに、日本における本種の遺伝的多様性や系統地理学的特徴についても検討していく必要がある。

これまでに、白山の高山帯から亜高山帯にかけての地域には北方系のきのこ類が分布することが指摘されていた(池田, 1992)が、今回のホコリヤグラタケの発見と系統解析の結果から、その一端が証明された。また、白山の高山帯から亜高山帯で採集された未同定種や未記載種と考えられるきのこ類の種数は、梶ら(1998)は30~40種としていたが、現在では約80種程度と倍増している(池田, 2014)。これらのことから、今後も白山の高山帯から亜高山帯におけるきのこ類の調査研究を引き続き行い、その多様性や分布の特徴を解明していく必要があると考える。

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり、白山高山帯および亜高山帯での菌類の野外調査に参加する機会を与えていただいた、池田良幸氏をはじめとする石川きのこ会の関係各位にお礼申し上げます。特に、野外調査では同会会員の河原 栄氏(金沢大学教授)、畠中譲二氏、旅 本光氏、都野展子氏(金沢大学准教授)にご協力いただいたことを深謝します。また、分子生物学実験に際してご協力頂いた国立科学博物館植物研究部の宇野邦彦氏ならびに南京沃氏に感謝いたします。なお、本研究は白山自然保護調査研究会平成26年度調査研究課題「白山におけるきのこ類の多様性と地理的分布に関する研究」の成果の一部であり、研究費を助成いただいたことに謝意を表します。

## 引用文献

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.
- Antonín, V. and Noordeloos, M. E. (1997) A monograph of *Marasmius*, *Collybia* and related genera in Europe. Part 2: *Collybia*, *Gymnopus*, *Rhodocollybia*, *Crinipellis*, *Chaetocalanthus* and additions to *Marasmiellus*. *Libri Botanici* 17: 1–256.
- Edgar, R. C. (2004a) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Edgar, R. C. (2004b) MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 113.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hosaka, K. (2009) Phylogeography of the genus *Pisolithus* revisited with some additional taxa from New Caledonia and Japan. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B* 35: 151–167.
- Hosaka, K. and Castellano, M. A. (2008) Molecular phylogenetics of Geastrales with special emphasis on the position of *Sclerogaster*. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B* 34: 161–173.
- Hosaka, K., Kasuya, T., Reynolds, H. T. and Sung, G. H. (2010) A new record of *Elaphomyces guangdongensis* (Elaphomycetaceae, Eurotiales, Fungi) from Taiwan. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B* 36: 107–115.
- Hughes, K. W. and Petersen, R. H. (2006) Relationships among *Collybia* s. str. from Greenland, North America and Eurasia. *Meddelelser om Grønland* 56: 99–105.
- Hughes, K. W., Petersen, R. H., Johnson, J. E., Moncalvo, J. M., Vilgalys, R., Redhead, S. A., Thomas, T. and McGhee, I. (2001) Infrageneric phylogeny of *Collybia* s. str. based on sequences of ribosomal ITS and LSU regions. *Mycological Research* 105: 164–172.
- 池田良幸(1992)キノコ。白山—自然と文化—(白山総合学術書編集委員会編), pp. 162–173. 北國新聞社, 金沢。
- 池田良幸(2014)追補北陸のきのこ図鑑 付石川県菌草集録。橋本確文堂, 金沢, 360pp.
- Kasuya, T. and Sato, S. (2009) Fructification of *Collybia cirrata* on mummified gleba of *Bovista dermoxantha* in Hokkaido, Northern Japan. *Mycotaxon* 107: 81–86.
- Kasuya, T., Hosaka, K., Uno, K. and Kakishima, M. (2012) Phylogenetic placement of *Geastrum melanocephalum* and polyphyly of *Geastrum triplex*. *Mycoscience* 53: 411–426.
- 糟谷大河・都野展子・橋屋誠・黒川悦子・宇野邦彦・保坂健太郎(2013)石川県小松市においてナガエノスギタケの発生により確認されたコウベモグラの営巣例, および日本産ナガエノスギタケの系統的位置に関する知見。小松市立博物館研究紀要 47: 23–34.
- Lennox, J. W. (1979) *Collybioid* genera in the Pacific Northwest. *Mycotaxon* 9: 117–231.
- Seutin, G. B., White, N. and Boag, P. T. (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69: 82–90.
- Swofford, D. L. (2002) PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony and other methods (\*PAUP version 4.0 beta 10). Sinauer, Sunderland.
- 梶 典雅・米山競一・池田良幸(1998)高山帯・亜高山帯のキノコ。平成9年度生態系多様性地域調査(白山地区)環境庁委託業務報告書, pp. 44–60. 岐阜県・石川県。

Vilgalys, R. and Hester, M. (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. W. (1990)

Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (eds.), *PCR protocols*. pp. 315–322. Academic Press, New York.