

ĐA DẠNG DI TRUYỀN MỘT SỐ LOẠI NẤM ĂN DỰA TRÊN TRÌNH TỰ ITS (INTERNAL TRANSCRIBED SPACER)

Liễu Như Ý¹ và Trần Nhân Dũng¹

ABSTRACT

Sixteen varieties of common cultivated mushroom in Mekong delta were investigated to observe their genetic diversity. Firstly, fruiting body samples of mushroom were collected. Then all of them were isolated in CHANG medium to get pure cultures of mycelium. DNA from mushroom hyphae was extracted by procedure adapted from Gardes and Bruns (1993). After that, ITS regions were amplified by PCR method with specific primers ITS1 and ITS4. Finally, the ITS sequences of sixteen mushroom varieties were analyzed and phylogenetic tree was created to express genetic relation among studied varieties. The result showed that mushroom varieties had diversity. The dendrogram indicated that mushroom varieties were closely related with high levels of bootstrap support. Genetic tree of studied varieties had two branches, each one had five varieties. The first one includes varieties belong to *Volvariella volvacea* and it was divided into two groups. The other branch which includes varieties of oyster mushrooms was also divided into two groups belongs to *Pleurotus cystidiosus*, *Pleurotus floridanus* strains, and *Pleurotus pulmonarius*. Both two golden needle mushroom samples were *Flammulina velutipes*. And the medicinal mushroom samples were belong to three strains including *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma gibbosum* và *Ganoderma tropicum*.

Keywords: Cultivated mushroom, dendrogram, ITS (Internal transcribed spacer), sequences

Title: Genetic diversity of common cultivated mushroom varieties based on its (internal transcribed spacer) sequences

TÓM TẮT

Mười sáu dòng nấm ăn ở các tỉnh Đồng bằng Sông Cửu Long đã được thu thập để khảo sát đa dạng di truyền. Quả thể các loài nấm được thu thập và phân lập trên môi trường Chang. DNA từ các tơ nấm được phân lập theo quy trình Gardes và Bruns (1993) có hiệu chỉnh. Vùng ITS1 + 5,8S + ITS2 được khuếch đại bằng PCR với 2 cặp mồi ITS1, ITS4. Trình tự ITS của 16 dòng nấm được phân tích và xác lập giản đồ phả hệ. Kết quả đã xác định các mẫu nấm rơm khảo sát đều thuộc loài *Volvariella volvacea*, các mẫu nấm bào ngư trắng thuộc loài *Pleurotus ostreatus*, các mẫu nấm bào ngư Nhật thuộc loài *Pleurotus cystidiosus*, nấm bào ngư xám thuộc loài *Pleurotus pulmonarius*, hai mẫu nấm kim châm thuộc loài *Flammulina velutipes*. Đối với các mẫu nấm linh chi thuộc 3 loài: *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma gibbosum* và *Ganoderma tropicum*. Giản đồ phả hệ cũng cho thấy mức tương quan di truyền giữa các loài nấm khảo sát với mức gắn bó bootstrap cao, có thể kết luận các loài này có nguồn gốc rất gần.

Từ khóa: Giải trình tự, giản đồ phả hệ, ITS (Internal transcribed spacer), nấm trồng

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay trồng nấm ăn là một ngành nông nghiệp quan trọng trên thế giới. Nấm không chỉ cung cấp dinh dưỡng như một loại thực phẩm giàu protein, không

cholesterol mà còn là nguyên liệu sản xuất nhiều loại dược phẩm. Năm 1997, tổng sản lượng nấm ăn và nấm dược liệu trên thế giới đạt giá trị khoảng 26-30 tỉ USD (Chang *et al.*, 2004). Riêng tại nước ta các nghiên cứu về nấm ăn phần lớn ở dạng sản xuất và nhân giống. Hoàng Ngọc Thịnh (2002) đã thử nghiệm nhân giống nấm rơm, nấm bào ngư và nấm mỡ từ nguồn giống nguyên chủng ra giống cấp 1, cấp 2 và cấp 3, sau đó đưa ra trồng thử nghiệm với mục đích tìm được nguồn giống có chất lượng cao cho tỉnh Hải Dương.

Do giá trị kinh tế ngày càng tăng lên mà các loài nấm ăn ngày càng có nhiều dòng được trồng tại nhiều nơi trên thế giới để đáp ứng nhu cầu tiêu thụ. Điều này dẫn đến nảy sinh sự nhầm lẫn giữa tên các dòng của cùng một loài hay khác loài gây khó khăn trong quá trình trồng và các nghiên cứu trong lĩnh vực nhân giống, cũng như làm mất thương hiệu ảnh hưởng đến người sản xuất khi không xác định đúng tên của các dòng nấm. Chính vì vậy, một số nước đã tiến hành các nghiên cứu khác nhau nhằm giải quyết vấn đề trên. Các đặc điểm hình thái là một phương pháp truyền thống để xác định sự đa dạng, tuy nhiên khả năng tin cậy của phương pháp bị ảnh hưởng bởi các yếu tố môi trường. Trái lại, việc áp dụng phương pháp đánh dấu phân tử (marker phân tử) ở mức độ DNA để phân biệt các dòng cho thấy có nhiều triển vọng trong việc định danh và đánh giá nhanh sự đa dạng di truyền của các loài nấm ăn. Các phương pháp sinh học phân tử: RAPD (Random amplified polymorphic DNA), AFLP (Amplified fragment length polymorphism), SSRs (simple sequence repeats), ISSR (the inter-simple sequence repeat) SCAR (strain-specific sequence-characterized amplified region), PCR RFLP đã được ứng dụng nghiên cứu đa dạng di truyền của các loại nấm ăn (Hongyan Su, 2008; Larraya et al, 2000; Martin *et al.*, 2004). Cặp mồi ITS1 và ITS4 được sử dụng để khuếch đại khu vực ITS trong các mẫu DNA của nấm (Han và Shin, 2007) Nghiên cứu này đã cung cấp nền tảng cho việc xác định nhanh và chính xác sự đa dạng của các dòng nấm.

Các đối tượng nấm được trồng phổ biến ở Đồng bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL) như nấm rơm (*Volvariella volvacea*), nấm bào ngư (*Pleurotus spp.*),...và nấm dược liệu như nấm linh chi (*Ganoderma lucidum*), bên cạnh đó nấm kim châm *Flammulina velutipes* cũng đang được tiêu thụ rộng rãi tại một số chợ và siêu thị thuộc khu vực ĐBSCL mặc dù loài nấm này chưa được trồng tại đây. Tuy nhiên, các nghiên cứu về những loài nấm này ở ĐBSCL hiện chỉ mới ở mức độ khảo sát một số đặc điểm hình thái, cách phân lập, giữ giống nấm mà chưa có nhiều nghiên cứu ở cấp độ phân tử và mối quan hệ di truyền của các giống nấm ăn, chưa có những cơ sở di truyền làm nền tảng cho việc chọn giống. Chính vì thế mà hiệu quả kinh tế của ngành trồng nấm nước ta mà cụ thể là ở ĐBSCL còn chưa cao, chưa đáng kể so với tiềm năng vốn có.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu thập các mẫu nấm thông qua kiểu hình và ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để xác định mối tương quan di truyền của chúng, góp phần vào việc phân loại chung của giới nấm, tìm hiểu nguồn gốc và mối liên hệ giữa các giống/dòng của chúng, góp phần vào công tác chọn giống, giúp người trồng nấm có được những giống chất lượng và mang lại hiệu quả kinh tế.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu thí nghiệm

2.1.1 Mẫu nấm

Mười sáu mẫu nấm được thu thập từ 6 tỉnh thuộc khu vực ĐBSCL. Nấm rơm thu tại Ô Môn - Cần Thơ (RomOMon), nấm rơm Vị Thanh - Hậu Giang (RomViTh), nấm rơm Lai Vung - Đồng Tháp (RomDoTh), nấm rơm Ngã Bảy - Hậu Giang (RomNBay), nấm rơm Long An (RomLoAn), bào ngư trắng Ô Môn - Cần Thơ (BNTOMon), bào ngư trắng Bến Tre (BNTBeTr), bào ngư nhật Bến Tre (BNNBeTr), bào ngư nhật Vĩnh Long (BNNViLo), bào ngư nhật Phụng Hiệp - Hậu Giang (BNNPhHi), và nấm bào ngư xám thu tại Bến Tre (BNXBeTr). Ba mẫu nấm được liệu gồm linh chi vàng thu tại Cần Thơ (LCVCaTh), linh chi vàng Bến Tre (LCVBeTr) và linh chi đen Cần Thơ (LCDCaTh). Riêng đối với nấm kim châm được thu tại siêu thị METRO – Cần Thơ, các mẫu nấm đã được đóng gói, giữ lạnh và nguồn gốc sản phẩm ghi trên bao bì: kim châm Trung Quốc (KchTrQu) và kim châm Đồng Nai – Việt Nam (KchViNa). Tất cả các mẫu nấm được chọn là những thể quả còn tươi, màu sắc sáng đẹp, không bị thương tổn.

2.1.2 Hóa chất

Hóa chất cho phân lập nấm: môi trường phân lập nấm là môi trường CHANG với các thành phần: agar 20g, D _ Glucose 20g, Pepton 2g, KH_2PO_4 0,46g, K_2HPO_4 1g, MgSO_4 0,5g, nước cất vừa đủ 1000ml và Thiamin (Vit B1) 0,01mg.

Hóa chất sử dụng cho phản ứng PCR và giải trình tự: dung dịch ly trích (100 mM Tris, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% w/v CTAB) (Merck), dung dịch TE, ethanol 70% và 96% (Merck), agarose, ethidium bromide (Bio-Rad), loading buffer (Bio-Rad), dNTPs (Promega), *Taq* polymerase (BiRDI), 1kb DNA ladder (Promega).

2.1.3 Thiết bị

Máy giải trình tự ABI 3130, máy nghiền Retsch MM200 (Germany), máy PCR Perkin Elmer 9700 (USA), máy li tâm Eppendorf Concentrator 5417C (Germany), thiết bị điện di..

2.2 Phương Pháp

2.2.1 Phân lập tơ nấm

Sau khi thu quả thể tại địa phương, các mẫu nấm được đưa về phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử Thực vật để phân lập nhằm mục đích thu được dòng thuần của nấm và lấy tơ nấm trích DNA. Quả thể của nấm tươi được lau sạch bằng bông thấm cồn 70° và phân lập bằng cách cấy mô. Mỗi mẫu nấm được bổ đôi và 1 miếng nhỏ mô thịt ở phần thân của tai nấm được phân tách và chuyển vào môi trường thạch (môi trường CHANG) trên các đĩa petri. Các đĩa petri được ủ ở 30°C và được kiểm tra mỗi ngày, đảm bảo không nhiễm các vi sinh vật khác.

2.2.2 Tách chiết DNA

Hệ sợi tơ của mỗi mẫu nấm được sử dụng cho tách chiết DNA theo phương pháp được hiệu chỉnh bởi Gardes và Bruns (1993), 50mg tơ nấm được nghiền khoảng 5 phút, thêm 500μl dung dịch ly trích, vortex và để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, sau đó đem ly tâm rồi thu lấy dung dịch bên trên. DNA được rửa bằng cồn 960 và

rửa 2 lần bằng cồn 70⁰. DNA sau đó được sấy trong máy sấy chân không 10 phút ở 45⁰C rồi hòa tan trong 100µl TE 0.1X. Cuối cùng DNA được kiểm tra chất lượng thông qua quá trình đo quang phổ và điện di trên gel agarose 0,8%. Những sản phẩm đạt yêu cầu được trữ ở -20⁰C cho những bước tiếp theo.

2.2.3 Thực hiện phản ứng PCR

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi ITS1 và ITS4 (White *et al.*, 1990)

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

Thành phần bao gồm: H₂O khử ion, PCR buffer 1X, dNTPs 200µM, MgCl₂ 2.5 mM, primer (ITS1 và ITS4) 100 pmol/µl, *Taq* polymerase 0.5 U/µl, DNA 50 ng/µl. Các chu kỳ nhiệt 30 chu kỳ: 95⁰C: 50 giây, 57⁰C: 1 phút 05 giây, 72⁰C: 1 phút 20 giây. Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5% với 90V trong khoảng 60 phút.

2.2.4 Giải trình tự (sequencing)

Tiến hành phản ứng cycle sequencing (PCR gắn huỳnh quang) và tinh sạch sản phẩm PCR theo kit Invitrogen. Phản ứng PCR (gắn huỳnh quang) được thực hiện trong thể tích 10 µl. Công thức cho 1 phản ứng 10 µl như sau: H₂O khử ion 3 µl, 1 µl Buffer 5x, 2 µl Primer PCR 3,2 pmol, 2 µl BigDye Terminator V3.1 2,5x, Sản phẩm PCR 2 µl, chu kỳ nhiệt PCR như sau: 96⁰C trong 1 phút (1 chu kỳ), 96⁰C trong 10 giây; 50⁰C trong 5 giây; 60⁰C trong 4 phút với 25 chu kỳ; kết thúc 4⁰C. Sau phản ứng PCR, tiến hành tinh sạch sản phẩm Cycle Sequencing, biến tính và giải trình tự trên máy giải trình tự ABI 3130.

2.2.5 Phân tích số liệu

Các trình tự được xếp hàng (Alignment) bằng phần mềm BioEdit 7.0. Sau đó dùng SeqVerter để chuyển định dạng (format) dữ liệu theo phần mềm PAUP. Phép toán parsimony thực hiện trên mỗi vùng và phân tích bootstrap 100 lần lặp lại với phần mềm PAUP* v4.0 b10 (Swofford, 2002), các chỉ số dưới đây được ghi nhận:

Chỉ số CI (Consistency Index): là tỉ số đo tương thích giữa một cây bất kỳ nào đó trong tổng số các cây được phân tích có tổng số nhánh ít nhất. Giá trị CI biến động trong khoảng 1.0 (tương thích tối đa) tiệm cận đến 0 (ít tương thích nhất). Giá trị CI càng lớn thì kết quả có mức độ tin cậy càng cao.

Chỉ số CI được tính bằng công thức: $CI = M/S$; M: số lượng nhỏ nhất có thể có của sự thay đổi tính trạng (bậc) trong một cây phát sinh loài bất kỳ. S: số lượng sự thay đổi tính trạng thật sự (bậc) trong cây phát sinh đang nói đến (cây phát sinh đã có ý nghĩa giải thích tất cả sự phân bố tính trạng của giống cần phân loại).

RI (Retention Index): chỉ số thể hiện số lượng tính trạng tương đồng của 2 hay nhiều giống cùng tổ tiên trên cây phân loại.

Chỉ số bootstrap: là tần số xuất hiện của một nhóm (cluster) trên số lần giản đồ được thiết lập. Đơn vị tính là % (phần trăm). Theo Felsenstein (1985) bootstrap là một công cụ hỗ trợ cho việc xây dựng cây phát sinh loài.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập tơ nấm và trích DNA

Các dòng nấm khảo sát sau thời gian ủ từ 5 – 15 ngày tùy thuộc vào từng loài nấm, hệ sợi nấm sẽ phát triển đầy trên môi trường CHANG. Tơ nấm của các dòng nấm rơm phát triển thành một hệ sợi trắng hơi trong, lan đầy mặt đĩa petri. Tơ nấm bào ngư cần thời gian phát triển lâu hơn nhưng mọc đan xen nhau dày hơn, màu trắng đục, sau khoảng 15 ngày tơ nấm bào ngư phát triển đầy bề mặt đĩa. Riêng đối với nấm bào ngư Nhật, khoảng sau 10 ngày bắt đầu có những giọt màu đen chứa bào tử tập trung xung quanh trung tâm hệ sợi nấm (Hình 2).



Hình 1: Quả thể các mẫu nấm thu được

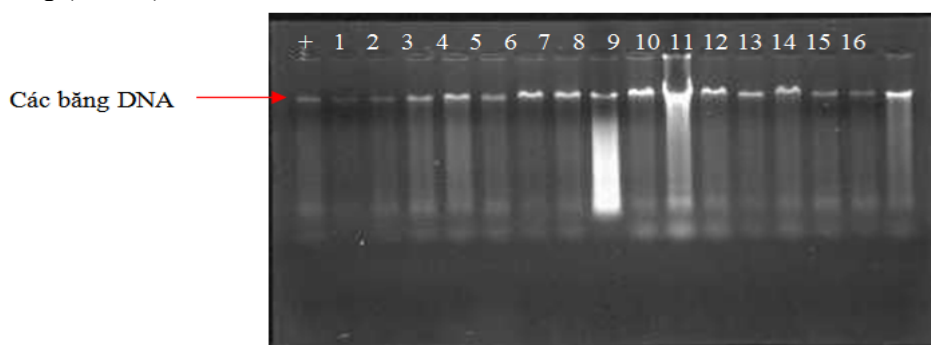
A. bào ngư nhật Bến Tre; B. nấm linh chi Bến Tre; C. nấm rơm Long An.



Hình 2: Hệ sợi tơ của các mẫu nấm

A. bào ngư nhật Bến Tre; B. nấm linh chi Bến Tre; C. nấm rơm Long An.

Sử dụng hệ sợi tơ nấm của từng mẫu nấm mới phân lập để trích DNA, kết quả kiểm tra trên gel agarose cho thấy bộ gen của mỗi dòng nấm đã được ly trích thành công (Hình 3).

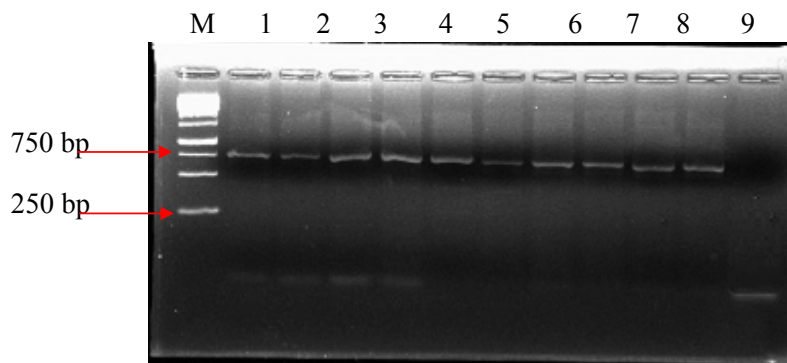


Hình 3: Các băng đoạn DNA trên gel agarose 0,8% của các mẫu nấm

(+): DNA chuẩn; 1 – 16: các mẫu nấm

3.1.1 Kết quả phân tích PCR

Sản phẩm PCR thu được có chất lượng tốt với một băng rõ duy nhất cho mỗi dòng nấm trên gel điện di (Hình 4). Các băng nằm ở vị trí khoảng 700 đến 750bp. Mỗi đoạn ITS1 và ITS4 có kích thước biến động trong khoảng 250-300bp, đoạn gene 5.8S có tính bảo toàn cao và dài 163 hay 164 bp (Baldwin *et al*, 1992). Như vậy, kích thước vùng gene ITS được khuếch đại là phù hợp.



Hình 4: Sản phẩm PCR vùng ITS của một số dòng nấm ăn

M. Ladder 1kb; 1. Rơm Ô Môn; 2. Rơm Vị Thanh; 3. Rơm Long An; 4. Rơm Đồng Tháp; 5. Rơm Hậu Giang; 6. BNT Cần Thơ; 7. BNT Bến Tre; 8. BNN Cần Thơ; 9. BNN Vĩnh Long; 10. BNN Hậu Giang; 1. Đối chứng âm

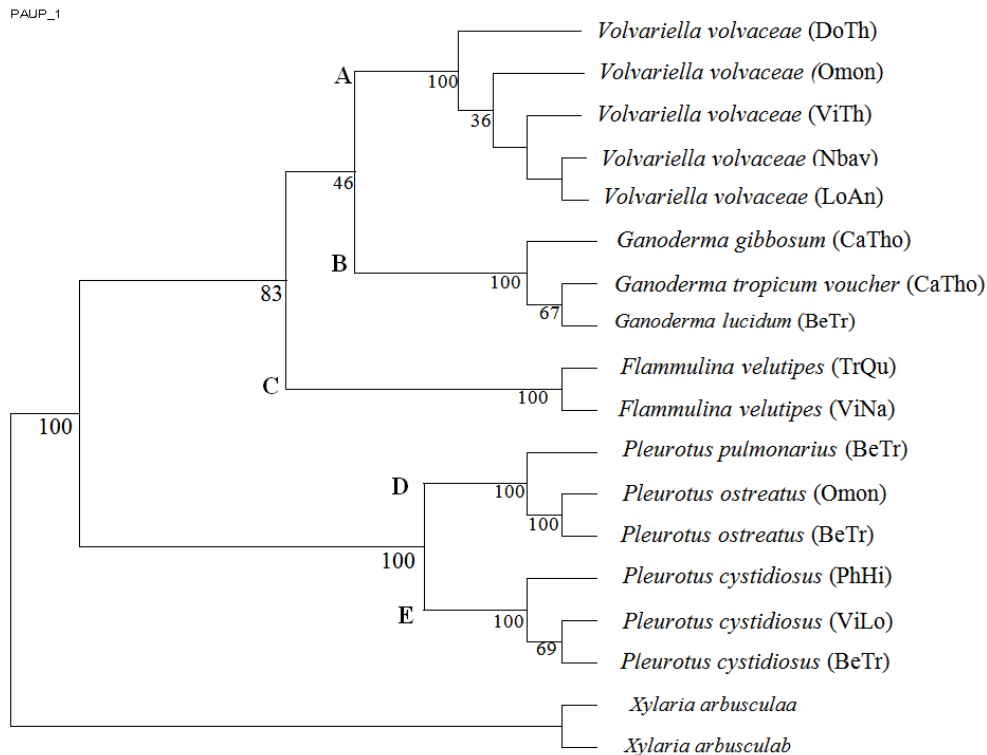
3.1.2 Phân tích phả hệ giữa các loài nấm nghiên cứu theo kiểu gen

Sau khi phân tích các trình tự, giản đồ phả hệ được vẽ như ở hình 5 với chỉ số CI (Consistency Index) = 0.8121, RI (Retention Index) = 0.9027, đây là chỉ số cho biết kết quả giải trình tự tốt, rất ít sai số, kết quả chấp nhận được.

Phân tích giản đồ phả hệ của 16 loài nấm ăn nghiên cứu với 2 loài nấm *Xylaria arbuscula* cùng thuộc nhóm nấm lớn trong phân loại giới nấm làm nhóm đối chứng (outgroup). Kết quả có thể phân chia thành 5 nhóm chính (Hình 5):

Nhóm A: gồm có 5 dòng nấm rơm thu tại 5 tỉnh khác nhau. Chúng đều thuộc loài *Volvariella volvaceae*. Chỉ số bootstrap của nhóm là 100%, như vậy các loại nấm rơm trên đều thuộc phân loại Fungi, Basidiomycota, Agaricomycetes, Agaricales, Pluteaceae, *Volvariella*, *V. volvacea*.

Nhóm B: gồm 3 loài *Ganoderma gibbosum*, *Ganoderma tropicum* voucher và *Ganoderma lucidum*, chỉ số bootstrap của nhóm là 100%. Trong nhóm này phân ra thành 2 nhóm nhỏ: hai loài *G. tropicum* và *G. lucidum* có chỉ số bootstrap là 67% so với loài *G. gibbosum*. Vì cả 3 loài này đều thuộc khóa phân loại nhưng *G. gibbosum* là loài nấm linh chi đen, còn *G. tropicum* voucher và *G. lucidum* là 2 loài nấm linh chi vàng được trồng phổ biến hiện nay đặc biệt *G. lucidum* đang trồng trên quy mô công nghiệp tại nhiều nước trên thế giới.



Hình 5: Giản đồ phả hệ (phylogenetic tree) của 16 loài nấm lớn (nấm có thể ăn được) được phân tích dựa trên trình tự ITS1 và ITS4. Các chỉ số CI = 0.8121; RI = 0.9027; chỉ số bootstrap được ghi trên đầu các nhánh trong giản đồ

Nhóm C: gồm hai dòng nấm kim châm thuộc loài *Flammulina velutipes*, chỉ số bootstrap là 100%.

Nhóm D: gồm 2 dòng bào ngư trắng thuộc cùng 1 loài *Pleurotus ostreatus* và nấm bào ngư xám thuộc loài *Pleurotus pulmonarius*, chỉ số bootstrap của nhóm là 100%.

Nhóm E: gồm 3 dòng nấm thu tại 3 tỉnh khác nhau nhưng chúng đều thuộc cùng 1 loài *Pleurotus cystidiosus*. Hơn nữa, 2 mẫu nấm thu tại Vĩnh Long và Bến Tre có sự khác biệt rõ so với mẫu nấm bào ngư nhật thu tại Phụng Hiệp với chỉ số bootstrap của chúng là 69%.

Nhóm D và nhóm E thuộc cùng một nhánh lớn có chỉ số bootstrap là 100%, nghĩa là khi so sánh và xếp nhóm thì hai giống nấm này xếp trong cùng một nhóm 100 lần, chứng tỏ chúng có thể có cùng nguồn gốc với nhau. Tuy nhiên, Ira và Agus (2010) đã từng thí nghiệm đồng hóa chất nguyên sinh của hai nhóm nấm bào ngư trên để tạo ra loại nấm mới nhưng cũng không thành công vì sự khác biệt di truyền.

4 KẾT LUẬN

Những dữ liệu phân tích dựa trên trình tự ITS cho chúng ta thấy triển vọng phát triển của chúng trong phân tích phả hệ các 16 dòng nấm trong vùng ĐBSCL. Năm

dòng nấm rơm khảo sát thuộc loài *Volvariella volvaceae*. Ba dòng nấm linh chi thuộc giống *Ganoderma* nhưng là ba loài khác nhau. Hai dòng nấm kim châm thuộc loài *Flammulina velutipes*. Sáu dòng nấm bào ngư đều thuộc giống *Pleurotus* và chia thành ba loài khác nhau. Kết quả phân tích trình tự còn giải thích được những đặc tính di truyền của chúng, dựa trên giản đồ phủ hệ 16 dòng nấm phân tích chia thành 2 nhánh lớn: nhánh thứ nhất gồm 3 nhóm là nấm rơm, nấm linh chi và nấm kim châm mặc dù về phân loại kiểu hình chúng hoàn toàn khác nhau. Nhánh lớn thứ hai là nhóm nấm bào ngư trắng, nhợt và xám, chúng có mức độ giống nhau cao với tỉ số bootstrap tuyệt đối là 100%. Những kết quả này là tiền đề cho những nghiên cứu di truyền cũng như công tác lai tạo giống sau này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plant: An example from the compositae. *Molecular Phylogenetics and evolution*, 1: 3-16.
- Chang, S. T. and P. M. Miles. 2004. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact, 2nd.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783 – 791 .
- Gardes, M., and T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113–118.
- Han, J.G. and H.D. Shin. 2007. New Record of *Xylaria persicaria* on Liquidambar Fruits in Korea. *Mycobiology* 35(4): 171-173.
- Hoàng Ngọc Thịnh. 2002. Dự Án Ứng Dụng Công Nghệ Sinh Học Để Nhân Giống Nấm Ăn Từ Nguyên Chúng Ra Cấp 1, Cấp 2, Cấp 3 Chủ Động Phục Vụ Phong Trào Sản Xuất Nấm Ăn Ở Tỉnh Hải Dương.
- Hongyan Su, Lei Wang, Linde Liu, Xiaoyan Chi, and Yuxiang Zhang. 2008. Use of inter-simple sequence repeat markers to develop strain-specific SCAR markers for *Flammulina velutipe*.
- Ira. D., and M. Agus. 2010. Protoplast fision between white and brown oyster mushroom. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 11(1): 16-23.
- Larraya, L.M, G. Pe'Rez, E. Ritter, A.G. Pisabarro, and L. Rami'Rez. 2000. Genetic Linkage Map of the Edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5290–5300.
- Martin, P., M. Muruke, K. Hosea, A. Kivaisi, N. Zerwas, and C. Bauerle .2004. A Rapid PCR-RFLP Method for Monitoring Genetic Variation Among Commercial Mushroom Species. *Biochem. and Mol. Biol. Educ.* 32: 390-394.
- Swofford, D. L. 2001. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b6. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- White, T.J., T. Burns, S. Lee, and T. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic, pp. 315-322.