

큰느타리 (*Pleurotus eryngii*) 품종 판별을 위한 초위성체 유래 다중 표지 개발

임착한 · 김경희 · 제희정 · 알리 아스자드 · 김민근 · 정완규 · 이상대 · 신현열 · 류재산*

경상남도농업기술원

Multiplex Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Discriminating *Pleurotus eryngii* Cultivar

Chak Han Im, Kyung-Hee Kim, Hee Jeong Je, Asjad Ali, Min-Keun Kim, Wan-Kyu Joung, Sang Dae Lee, HyunYeol Shin and Jae-San Ryu*

Gyeongsangnam-do Agricultural Research and Extension Services, Jinju 660-360, Korea

ABSTRACT : For development of a method for differentiation of *Pleurotus eryngii* cultivars, simple sequence repeats (SSR) from whole genomic DNA sequence analysis was used for genotyping and two multiplex-SSR primer sets were developed. These SSR primer sets were employed to distinguish 12 cultivars and strains. Five polymorphic markers were selected based on the genotyping results. PCR using each primer produced one to four distinct bands ranging in size from 200 to 300 bp. Polymorphism information content (PIC) values of the five markers were in the range of 0.6627 to 0.6848 with an average of 0.6775. Unweighted pair-group method with arithmetic mean clustering analysis based on genetic distances using five SSR markers classified 12 cultivars into two clusters. Cluster I and II were comprised of four and eight cultivars, respectively. Two multiplex sets, Multi-1 (SSR312 and SSR366) and Multi-2 (SSR178 and SSR277) completely discriminated 12 cultivars and strains with 21 alleles and a PIC value of 0.9090. These results might be useful in providing an efficient method for the identification of *P. eryngii* cultivars with separate PCR reactions.

KEYWORDS : Cluster analysis, Cultivar, *Pleurotus eryngii*, Polymorphism information contents (PIC), Simple sequence repeat (SSR)

큰느타리(새송이, *Pleurotus eryngii*)는 유럽의 지중해 연안부터 독일 북부까지 초원지대에 자생하는 대표적인 균류로서 단단하고 향이 있으며 요리학적 가치가 우수하다고 알려져 있어 경제적으로 매우 중요한 버섯이다[1]. 또한 식용적인 가치뿐만 아니라 에르고스테롤, 항산화활성, Angiotensin converting enzyme 저해활성, 그리고 글루칸

함량 및 이의 프로바이오틱 활성 등의 기능성 물질이 함유되어 건강식품으로서도 주목 받고 있다[2-4]. 큰느타리는 1950년대에 유럽지역에서 인공재배에 성공하였고[5], 대만, 일본, 한국, 중국에서 생산이 되고 있으며 농가에 보급된 이래로 지속적인 생산량을 보이고 있다. 또한 국내 버섯생산량의 35%에 해당하는 54,820톤이 생산되어 전체 버섯 중 1위를 기록한 주요 농산자원이다.

품종 또는 유전자원의 유전적 다양성을 분석하고 그들 간의 유연관계를 분석하는 작업은 육종에 이용되는 품종 육성 과정의 효율성 증대와 유전 변이의 확대에 효과적으로 이용될 수 있다. 이전에는 버섯을 구분할 때 자실체의 형태, 개체의 발달과정 등 형태적 및 표현형적 특성에 의한 유전적 다양성을 평가하여 왔으나 이러한 방법은 가까운 근연종간에는 사용이 제한적이며, 대상형질이 환경의 영향을 받기 쉬운 경우라면 다양성의 평가가 어려울 수 있다. 또한, 다양한 경로를 통한 수집 및 육종에 의해서 품종들의 기원이 모호해졌기 때문에 품종간의 차이를 더욱 확실하게 구분할 수 있는 구분법의 개발이 필요해지고 있는

Kor. J. Mycol. 2014 June, 42(2): 159-164
<http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2014.42.2.159>
 pISSN 0253-651X • eISSN 2383-5249
 © The Korean Society of Mycology

*Corresponding author
 E-mail: coolmush@korea.kr

Received May 13, 2014
 Revised June 20, 2014
 Accepted June 26, 2014

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

실정이다[6].

분자유전학적 방법에 의한 생물종의 구분은 형태적 특성에 관계없이 보다 쉽고 정확하게 유전적 특성 평가가 가능하며 이들의 종류에는 RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (randomly amplified polymorphism DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphism), SNP (single nucleotide polymorphism), 및 SSR (simple sequence repeat) 등 다양한 DNA 표지인자가 개발되어 유전적 다양성의 평가, 유전자원의 도입과 선발, 계통선발 및 품종구별 등 육종에 많이 이용되고 있다[7]. DNA 표지인자 중 microsatellite라고도 불리는 SSR (simple sequence repeat)은 genome 상에 존재하는 단순반복 염기서열의 반복 횟수의 차이로 인해 다형성(polymorphism)이 나타나며, 기존에 개발된 DNA 표지인자보다 다형성 정도가 아주 높아서 유전적 다양성과 유연관계를 평가하는데 많이 이용되고 있다[8].

분자마커는 표지인자 개발, 유전자 지도 작성, 유전자원 평가 및 품종 구분 등에 활용되어 왔고, 육종 기술 발전에 진보를 가져왔다[9,10]. 버섯의 경우는 식물이나 동물보다 분자마커의 도입이 늦게 시작되어 육종 기술에의 활용도가 낮은 실정이다. 최근 RAPD marker 또는 AFLP marker를 이용하여 SCAR (Sequence characterized amplified region) marker로의 전환에 관한 연구가 느타리에서 활발히 이루어졌다[11,12]. 또한, 경제적으로 중요한 몇몇의 버섯 종인 양송이, 느타리와 표고 등에서 RAPD, AFLP, SNP나 SSR 분자 표지를 이용하여 품종을 판별하거나 유전자 지도를 작성하는데 사용되어 왔다[13-16]. 느타리에서는 품종간 ITS-rDNA 염기서열분석, RAPD 핵산지문법에 의해 품종구분이 성공적으로 적용된 바 있으며[17,18] 포자결핍 돌연변이 종에서 AFLP를 이용한 유전자 지도작성이 보고된

바 있다[19]. 현재 국내에 재배되고 있는 느타리 품종은 국내육성품종과 외국유래 품종이 다양하게 존재하여 품종별로 다른 재배법이 적용되어야 하는 등 품종구별의 필요성이 대두되고 있다.

본 연구에서는 국내에서 재배되는 느타리의 대표적인 품종과 유연관계가 먼 계통을 포함한 12개 품종에 대해 SSR 마커를 이용하여 다형성을 분석하고 품종간의 유연관계를 규명하고자 하였다. 이를 바탕으로 느타리 품종판별이 가능한 초위성체 유래 다중 표지 마커(multiplex-SSR marker)를 개발하였다.

재료 및 방법

시험균주

시험재료는 국내에서 육성 또는 외국에서 도입한 품종 및 국내보존기관 보유종 등을 사용하였다(Table 1). MCM (mushroom complete medium) 배지를 사용하여 25°C에서 배양하여 사용하였고, 필요 시 4°C에 저장하였다. 장기보존을 위하여 균사가 만연한 MCM 배지를 0.5×0.5 cm로 잘라서 mineral oil (Sigma, USA)에 넣어 4°C에 보관하였다.

DNA 추출

각 계통의 균사가 만연된 MCM 배지를 1×1 cm의 크기의 절편으로 자른 5개의 조각을 100 mL의 MCM 액체배지에 약 10일 간 배양하였다. 동결건조기에서 3일 간 건조시킨 후 막사 사발에서 분쇄하였다. 분쇄한 시료를 약 500 µL 씩 분주한 후 동일 부피의 SDS buffer (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, 2% SDS, pH 9.5)를 가하여 잘 섞은 뒤에 65°C에서 10분 동안 세포를 파괴시켰다. 이후 13,000 rpm에서 10분 간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 상등액에 동량의

Table 1. *Pleurotus eryngii* cultivars used in this study

No.	Cultivars	Characteristics	Origin and genetic background
1	Keuneutari No.2	High yield and quality	Unknown
2	Aeryni	Dark cap color, Thick cap	Korea, Hybrid (Ga5Na5s47-12 38)
3	Aeryni3	Precocious, high yield	Korea, Hybrid (Aeryni × KNR2312)
4	Saesongi1ho	Precocious	Korea, Hybrid(A8B8)
5	Keuneutari No.1	Wide cap, Meaty fresh	Unknown
6	Gonji No.3	Dark cap color	Korea, Hybrid
7	Gonji No.8	Long Stipe, Meaty fresh	Korea, Hybrid
8	Dan Bi	Low pin-heading	Korea, Hybrid (KNR2312 × KNR2596)
9	KNR2503	Precocious	Unknown
10	KNR2514	Wild type	Italy, Mauritius
11	KNR2519	Wild type	Greece, Northeastern, Evosarea
12	KNR2518	Wild type	Iran, Tchevan province

KNR: Kyungnam rural development administraiton

PCI (phenol/chloroform/isoamylalcohol, 25/24/1) 용액을 넣고 섞은 뒤 13,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 상등액을 회수하였다. 같은 조작을 3~4회 더 반복한 후, 최종적으로 얻어진 상등액에 2.5배의 100% 에탄올과 0.1배의 3 M NaOAc를 이용하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 획득한 후 70% EtOH로 씻고 TE (pH 8.0) buffer로 녹여서 Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA)으로 정량 후 30 ng/L로 희석하여 다음 실험에 사용하였다.

SSR 분석

큰느타리 품종의 유전적 유연관계 및 품종식별에 적합한 SSR 마커를 선별하기 위하여 기존에 *P. eryngii* KNR2312 P5 전체 유전자 염기서열을 바탕으로 개발된 484개의 SSR 마커를 이용하였다[20]. 30 ng의 genomic DNA, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 10 pmol primer, 0.5 unit Taq polymerase가 포함된 20 μL의 PCR mixture를 이용하여 다음과 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. 초기 melting을 위하여 95°C에서 4분 간 두고 95°C에서 20초간 denaturation, 52°C에서 40초 간 annealing, 72°C에서 30초 간의 extension의 과정을 35회 반복한 후, 5분 동안 최종 extension을 수행하였다. 증폭된 DNA 밴드는 Safe Red stain (iNtRON Biotechnology, Korea)이 첨가된 3% agarose gel 상에서 전기 영동 후 관찰 하였다. Multiplex PCR의 경우 SSR 분석에서 선별된 4개의 마커를 Multi-1 (SSR312, SSR366)와 Multi-2 (SSR178, SSR277) 두 개의 세트로 나누어 SSR 분석에서 사용된 동일한 PCR mixture에 primer를 각각 10 pmol씩 첨가한 후 총 반응용액이 20 μL가 되도록 멸균수를 첨가하여 SSR 분석에서 사용된 같은 방법으로 분석하였다.

품종간의 유연관계 분석을 위하여 InfoQuest FP software (BIORAD Laboratories, Spain)를 이용하여 밴드패턴

인식하여 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average) 분석방법으로 dendrogram을 작성하였다[21]. SSR 표지인자의 다양성 분석은 전기영동 후 band가 있는 것을 “1”, 없는 것을 “0”으로 하여 data matrix를 작성하였으며, 이 값을 근거로 PIC calculator Extra (<http://www.genomics.liv.ac.kr>) 프로그램을 사용하여 PIC (polymorphism information content) 및 이형접합성(heterozygosity)을 계산하였다.

결과 및 고찰

큰느타리 품종 구분 SSR 마커 선별

1차로 SSR primer 484개에 대해 다형성의 패턴을 보이는 마커를 선별하기 위하여 큰느타리2호와 애린이, 새송이 1호를 이용하여 PCR 반응을 실시하여 다형성을 보이는 275개의 마커를 선별하였다. 큰느타리 12품종에 대한 계통 분석을 위하여 선별된 마커를 이용하여 PCR 반응을 실시하여, 밴드의 패턴이 뚜렷하고, 높은 다형성을 나타내며 재현성이 높은 다섯개의 마커를 최종 선별하였다(Table 1 and 2). 각 PCR 반응에서 선별된 다섯개의 SSR 마커를 큰느타리 12품종에 적용한 결과 200~300 bp 범위에서 서로 크기가 다른 DNA 단편들이 한 품종당 1~4씩 증폭됨을 확인하였다(Fig. 1). 또한, 몇몇의 품종에서는 반응물의 예상 크기보다 크거나 작은 여러 개의 밴드가 동시에 관찰되었다(Fig. 1). 대립유전자 개수와 크기의 차이는 품종판별에 이용된 마커의 결합부위(locus)가 다르고, 분석에 사용된 품종의 유전적 다양성 정도가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 각 마커의 다양성 정도를 나타내어 주는 PIC 값은 0.6627에서 0.6848의 범위로 나타나 큰느타리 품종을 구분할 수 있는 다양성 정보가 높은 것으로 나타났다(Table 2). PIC 값이 높은 이유는 1차 선별 결과 밴드패턴이 선명하고 다형성이 높은 SSR 마커 위주로 선별하여 분석하였기 때문

Table 2. SSR markers used in this study

No.	Name	Primer sequence (5' - 3')	Repeat motif	No. of PCR bands	Tm (°C)	Size (bp)	He	PIC
1	SSR178-F	GAGTGTAACAACGATATCG	(GGA)9	5	50	245	0.7308	0.6815
	SSR178-R	CTCTAGTTGGATTACTCGG						
2	SSR277-F	ATCACTGTCACCTGGAGAAG	(TCA)10	6	52	285	0.7298	0.6813
	SSR277-R	GGTCCTTGAAGAACATAGG						
3	SSR312-F	GAGACAGGTGAATGCATAG	(GAT)7	5	50	295	0.7270	0.6771
	SSR312-R	GGGTAAGGATCTTTCTACTC						
4	SSR366-F	CATATGGCCTCCAGTATAG	(CATCAG)4	5	50	298	0.7301	0.6848
	SSR366-R	CCTGAACTGTTATCTAGTGG						
5	SSR278-F	GTCTGTCCACCCTATCACATT	(CACAAA)5	6	52	277	0.7075	0.6627
	SSR278-R	GTAGTCAAGAGGTGAATGG						
Average				5.4			0.7250	0.6775

Tm, annealing temperature; He, heterozygosity; PIC, polymorphism information contents.

Table 3. The number of allele, heterozygosity (He), polymorphism information contents (PIC) of multiplex set

Multiplex sets	Primer	No. of PCR band	He	PIC	Allele size range (bp)	Total ^a	No. of alleles	He	PIC
Multi-1	SSR312 SSR366	8	0.800	0.7716	280-380	Set	21	0.9152	0.9090
Multi-2	SSR178 SSR277	13	0.855	0.8392	200-320				
Average		10.5	0.8275	0.8054					

^aPrimers consisting Multi-1 and Muti-2 sets were used for separate PCR reactions to analyze the cultivar identification.

인 것으로 사료된다. 이형접합성은 평균 0.725의 값을 나타내었다.

품종간 유연관계 분석

각 품종별로 증폭된 DNA 패턴을 InfoQuest™ FP Software를 사용하여 인식한 후 UPGMA 방법으로 클러스터링하였다(Fig. 2). 수집된 큰노타리 12개 품종은 전체 유사도 지수 0.65에서 0.92의 범위로 나타났으며 유사도 지수 0.79에서 크게 2개의 그룹으로 나눌 수 있었다. Cluster 1은 큰노타리 1호를 포함한 4개 품종이며, 제 2그룹(II)은 큰노타리 2호, 애린이 3을 포함한 8개 품종이었다. 또한 Cluster 2은 유사도 지수 0.85에서 큰노타리 2호를 포함하는 G2와 애린이 3을 포함한 G3의 소그룹으로 나눌 수 있었다. G1의 KNR2503은 품종의 조기수확 형질을 가져서 새송이 1호, 애린이, 애린이 3 등의 품종 육종에 모본으로 사용되었지만 낮은 품질을 개선하기 위하여 큰노타리 2호를 반복해서 교배하였기 때문에 유전적으로 거리가 먼 것으로 나타난 것으로 사료된다. KNR2503, KNR2518, KNR2519, KNR2514의 경우에는 이전에 Ro 등[17]이 RAPD를 바탕으로 dendrogram을 작성한 결과와 유사도 지수에서 비슷한 값을 나타내었다. 큰노타리 2호를 모본으로 사용한 새송이 1호와 애린이는 같은 G2의 소그룹으로 분류되었다. 예외적으로 애린이 3을 모본으로 사용한 곤지 3호와 단비는 애린

이 3과 다른 소그룹을 이루었다.

초위성체 유래 SSR 다중 표지 개발

선발된 다섯개의 SSR 마커를 조합하여 품종 판별용 primer set를 제작하고자 하였다. 이 중 SSR178은 큰노타리 2호, 애린이, 새송이 1호, 곤지 3호, 단비 품종에서 동일한 패턴이 나타났고, SSR277은 큰노타리 2호, 애린이, 곤지 3호 품종에서 동일한 패턴을 나타냈다. 또한, SSR312는 큰노타리 2호, 애린이 3, 곤지 3호, 단비, KNR2514에서 동일패턴을 보였다. SSR366번의 경우 밴드의 수가 많고 패턴이 촘촘하여 분석이 어려우나 다른 마커에서 항상 같은 패턴을 보여 품종 판별이 어려웠던 큰노타리 2호와 곤지 3호에서 분리된 밴드 패턴을 볼 수 있었다. 품종 간 식별이 가능한 최소 마커 조합을 결정하기 위하여 SSR 마커를 다양한 경우의 수로 PCR반응과 gel 밴드 분석을 한 결과 총 4개의 마커를 SSR312와 SSR366, SSR178와 SSR277의 두개 조합으로 이용한 결과 밴드가 뭉치거나 끌리지 않고 12개의 품종이 육안으로 모두 식별되었다(Fig. 3). SSR312번과 SSR366번의 조합을 Multi-1, SSR178과 SSR277번의 조합을 Multi-

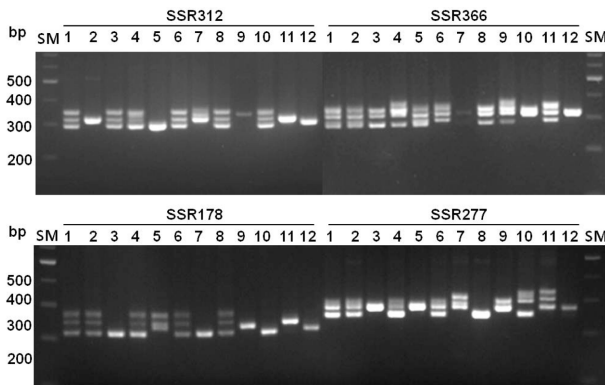


Fig. 1. PCR polymorphism of 12 *P. eryngii* cultivars by SSR primers, SSR312, SSR366, SSR178 and SSR277. Lane 1-12 corresponded to the *P. eryngii* cultivars in Table 1. SM, size marker (100 bp plus ladder).

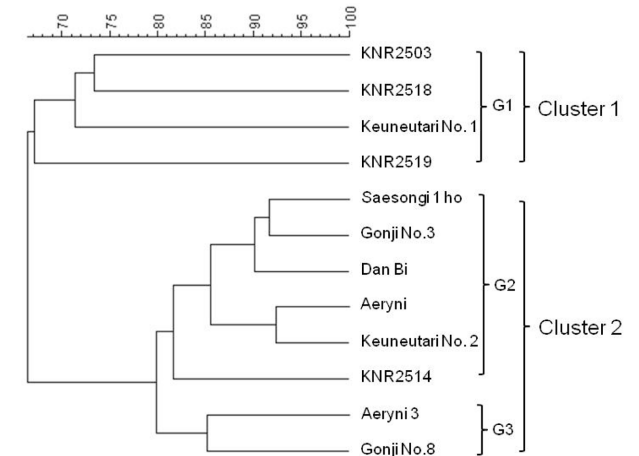


Fig. 2. A UPGMA dendrogram based on genetic distance by five SSR markers in 12 *P. eryngii* cultivars. Band pattern reorganization was performed with the InfoQuest™ FP software using dice correlation coefficient and the UPGMA algorithm. Clusters and small groups divided by the analysis are indicated at the right side.

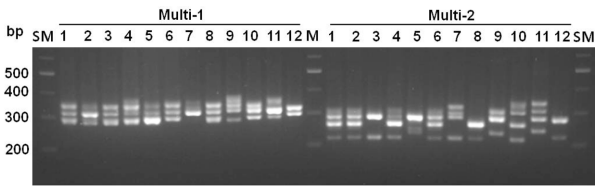


Fig. 3. PCR Polymorphism of 12 *P. eryngii* cultivars amplified by two multiplex SSR marker sets. SSR312 and SSR366 comprised of Multi-1 while SSR178 and SSR277 comprised of Multi-2. SSR Lane 1-12 corresponded to the *P. eryngii* cultivars in Table 1. SM, size marker (100 bp plus ladder).

2로 명명하였다. 총 4개 마커 조합을 이용 시에 전체 PCR 다형성 밴드수는 21개로 또한, 0.9090의 높은 PIC 값과 0.9152의 높은 이형접합성 값을 얻을 수 있었다. 이들 네개의 SSR 마커를 개별로 분석하였을 때는 평균 0.6775의 PIC 값을 얻을 수 있었던 반면, multiplexing 결과 PIC 값이 0.9090를 나타내어 공시된 12개의 품종을 쉽게 구분이 가능하였다.

적 요

큰느타리 품종구분을 위한 마커의 개발을 위하여 큰느타리 전체 유전자 염기서열을 바탕으로 제작한 484개의 SSR 마커를 사용하여 다형성 분석을 실시하였다. 그 결과 각 275개의 primer에서 다형성이 관찰되었다. 이 중 품종간에 다양한 패턴을 나타내는 5개의 마커를 최종 선발하였다. 이들 마커의 PIC 값은 0.6627에서 0.6848로 나타났고, 평균 값은 0.6775였다. 이 결과를 밴드 이미지 인식 방법으로 dendrogram을 작성하였다. UPGMA 집괴분석 결과, 큰느타리 품종은 크게 Cluster 1과 Cluster 2로 구분되었다. SSR primer를 이용한 PCR 결과 나타나는 품종별 고유의 DNA 밴드를 품종특이적 마커로 개발하기 위하여, 선발된 마커 중에서 SSR312과 SSR366, SSR178과 SSR 277 마커를 조합하여 초위성체 유래 다중 표지 세트를 개발하였다. Multiplex-SSR 마커의 사용을 통해 두번의 PCR 반응만으로 본 연구에서 사용된 12개의 큰느타리 품종을 구분할 수 있었다.

REFERENCES

1. Miles PG, Chang ST. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2004. p. 1-4, 207.
2. Carbonero ER, Gracher AHP, Smiderle FR, Rosado FR, Sasaki GL, Gorin PA, Iacomini M. A β -glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. Carbohydr Polym 2006;66:252-7.
3. Jang MJ, Lee YH, Kim JH, Ju YC. Effect of LED light on primordium formation, morphological properties, ergosterol content and antioxidant activity of fruit body in *Pleurotus eryngii*. Kor J Mycol 2011;39:175-9.

4. Kang TS, Jeong HS, Lee ML, Park HJ, Jo TS, Ji ST, Sin MG. Mycelial growth using the natural product and angiotensin converting enzyme inhibition activity of *Pleurotus eryngii*. Kor J Mycol 2003;31:175-80.
5. Rajarathnam R, Bano Z. *Pleurotus* mushrooms. Part 1A. Morphology, life cycle, taxonomy. breeding and cultivation. Crit Rev Food Sci Nutr 1987;26:157-222.
6. Chen Y, Nelson RL. Genetic variation and relationships among cultivated, wild and semiwild soybean. Crop Sci 2004;44:316-25.
7. Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjiondjop MN. An overview of molecular marker methods for plants. Afr J Biotechnol 2006;5:2540-68.
8. Li YC., Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Mol Ecol 2002;11:2453-65.
9. Bernardo R. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years. Crop Sci 2008;48:1649-64.
10. Collard BC, Mackill DJ. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci 2008;363:557-72.
11. Seo KI, Jang KY, Yoo YB, Park SY, Kim KH, Kong WS. Development and application of Weonhyeong strain-specific SCAR marker in *Pleurotus ostreatus*. Kor J Mycol 2011;39: 22-30.
12. Seo KI, Jang KY, Yoo YB, Park SY, Kim KH, Kong WS. Development of Suhan strain-specific SCAR marker in *Pleurotus ostreatus*. Kor J Mycol 2011;39:31-8.
13. Foulongne-Oriol M, Spataro C, Cathalot V, Monllor S, Savoie J. An expanded genetic linkage map of an intervarietal *Agaricus bisporus* var. *bisporus* \times *A. bisporus* var. *burnettii* hybrid based on AFLP, SSR and CAPS markers sheds light on the recombination behavior of the species. Fungal Genet Biol 2010;47:226-36.
14. Larraya LM, Pérez G, Ritter E, Pisabarro AG, Ramírez L. Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Appl Environ Microbiol 2000;66:5290-300.
15. Okuda Y, Murakami S, Matsumoto T. A genetic linkage map of *Pleurotus pulmonarius* based on AFLP markers, and localization of the gene region for the sporeless mutation. Genome 2009;52:438-46.
16. Terashima K, Matsumoto T, Hayashi E, Fukumasa-Nakai Y. A genetic linkage map of *Lentinula edodes* (shiitake) based on AFLP markers. Mycol Res 2002;106:911-7.
17. Ro HS, Kim SS, Yu JS, Jeon CO, Lee TS, Yoo J, Lee CW, Kim JW, Lee HS. Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis, RAPD fingerprinting and physiological characteristics. Mycol Res 2007;111:710-5.
18. Zervakis GI, Venturella G, Papadopoulou K. Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. Microbiology 2001; 147:3183-94.
19. Okuda Y, Ueda J, Obatake Y, Murakami S, Fukumasa Y, Matsumoto T. Construction of a genetic linkage map based on amplified fragment length polymorphism markers and development of sequence-tagged site markers for marker-assisted selection of the sporeless trait in the oyster mushroom (*Pleu-*

- rotus eryngii*). Appl Environ Microbiol 2012;78:1496-1504.
20. Kim KH, Im CH, Je HJ, Kim MK, Chae SM, Ryu JS. Complete genome sequence of *Plurotus eryngii* KNR2312 using the Next Generation Sequencing (NGS). Iran. In: International symposium & annual meeting: a new era of biotechnology and bioeconomy; 2012 Jun 27-29; South Korea, Busan: Korean Society for Microbiology and Biotechnology; 2012. p. 374.
 21. Durbin R., Eddy S., Krogh A., Mitchison G., Building phylogenetic trees, Chapter 7, Biological Sequence Analysis, Cambridge University Press, 1998. p. 160-90.