

Mutasi Sinar Gamma untuk Meningkatkan Kandungan Metabolit Sekunder dan Analisis Isozim Jamur Tiram

IRA DJAJANEGARA¹, RETNO LESTARI², HARSOYO³, PRIYO WAHYUDI^{1*}

¹Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Bioindustri, BPPT
Jl. MH. Thamrin 8, Gd-II, Lt 15, Jakarta, 10340

²Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Indonesia, Kampus UI, Depok

³Badan Tenaga Atom Nasional, Pasar Jumat, Jakarta Selatan

Diterima 2 Desember 2003, Disetujui 6 Februari 2004

Abstract: Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) is one of the commonly consumed mushrooms due to its nutritious as well as its pharmaceutical value. It has been known that this mushroom contains several substances such as interferon inducer to help prevent several diseases i.e. hepatitis and many others. There are three cultivars of oyster mushroom based on the color of their fruit body, namely white oyster mushroom (*Pleurotus floridae*), grey oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) and brown oyster mushroom (*Pleurotus cystidiosus*). A possibility to increase its pharmaceutical value is mutation using Gamma ray. The doses of mutation used are 0.25 KGy, 0.5 KGy, 0.75 KGy, and 1.0 KGy respectively. Since most of the pharmaceutical substances are secondary metabolite products of this mushroom, the mutation is intended to increase these metabolites. In this preliminary experiment, the mutation process is observed using isozyme analysis of the mutated mycelia as the indicator.

Key words: *Pleurotus ostreatus*, secondary metabolite, gamma ray, mutation, isozyme

PENDAHULUAN

Jamur tiram yang juga dikenal dengan nama shimeji atau *oyster mushroom* adalah salah satu jenis jamur yang enak dikonsumsi dan banyak digemari di berbagai negara. Di Indonesia, budidaya jamur tiram secara komersial banyak ditemukan di daerah Lembang. Hal ini disebabkan karena suhu dan kelembaban lingkungannya mendukung pertumbuhan miselium dan tubuh buah jamur ini. Jamur tiram yang biasa dibudidayakan meliputi varietas yang berwarna putih (*Pleurotus floridae*), abu-abu (*Pleurotus sajor-caju*), coklat (*Pleurotus cystidiosus*) dan merah (*Pleurotus flabellatus*).

Jamur tiram memiliki kandungan protein, lemak, fosfor, besi, tiamin, dan riboflavin lebih tinggi dibandingkan dengan jenis jamur lain. Jamur tiram juga mengandung 18 macam asam amino esensial, di antaranya isoleusin, lisin, metionin, sistein, fenilalanin, tirosin, triptofan, valin, arginin, histidin, alanin, asam aspartat, asam glutamat, glisin, prolin, dan serin⁽¹⁾.

Khasiat jamur tiram untuk kesehatan antara lain

menghentikan perdarahan dan mempercepat pengeringan luka pada permukaan tubuh. Jamur tiram juga mampu mencegah penyakit diabetes mellitus, penyempitan pembuluh darah, tumor dan kanker, kelenjar gondok, dan influenza. Selain itu, jamur tiram juga membantu menurunkan kolesterol darah, menambah vitalitas, dan daya tahan tubuh.

Salah satu upaya meningkatkan kandungan bahan aktif pada jamur tiram adalah dengan mutasi secara acak yang menggunakan radiasi sinar gamma. Jenis radiasi pengion yang paling sering digunakan adalah sinar gamma. Sinar gamma memiliki energi yang lebih tinggi sehingga daya penetrasinya ke dalam sel lebih besar. Dengan demikian, sinar gamma sangat efektif untuk menembus dinding sel yang dimiliki jamur. Sinar gamma dapat berasal dari isotop Cobalt-60, Cesium-137, atau Technetium-99^(2,3,4).

Untuk dapat memastikan apakah mutasi yang telah dilakukan telah menyebabkan perubahan genetik pada jamur tiram sebelum ditumbuhkan sampai siap panen dan dianalisis kandungan metabolit sekundernya, maka dilakukan analisis isozim pada miselia jamur yang telah diradiasi. Isozim adalah enzim homolog yang memiliki perbedaan struktur molekular, namun ditemukan pada organisme yang sama. Perbedaan struktur molekular tersebut

* Penulis korespondensi, Hp. 08161119981,
e-mail: wahyudi@bppt.go.id

diantaranya disebabkan oleh perbedaan gen⁽⁵⁾. Isozim dapat digunakan sebagai penanda atau marka genetik karena isozim merupakan protein yang mencerminkan terjadinya perubahan dalam sekuens DNA melalui perubahan komposisi asam aminonya. Isozim telah banyak dimanfaatkan dalam analisis penyilangan, keragaman genetik dalam dan antar populasi, varietas, dan uji sifat ketahanan suatu organisme⁽⁶⁾.

Isozim pada umumnya memperlihatkan pola pewarisan Mendel. Ekspresi isozim bersifat kodominan, penetrasi penuh, dan tidak dijumpai adanya peiotropisme maupun epistasis. Heterozigositas alel dapat diketahui dari intensitas pita yang dibentuknya pada elektroforesis⁽⁶⁾. Di antara enzim-enzim ekstra-selular yang dihasilkan jamur, beberapa yang sering digunakan untuk penelitian isozim yaitu esterase, peroksidase, fosfatase asam dan dehidrogenase malat.

Berdasarkan beberapa pertimbangan, maka pada penelitian pendahuluan ini dilakukan radiasi sinar gamma pada jamur tiram *P. sajor-caju*, *P. cystidiosus*, dan *P. floridae* dengan dosis 0,25 kGy, 0,5 kGy, 0,75 kGy, dan 1 kGy. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati terjadinya perubahan pola isozim esterase, fosfatase asam dan dehidrogenase malat pada jamur tiram *P. sajor-caju*, *P. cystidiosus* dan *P. floridae* yang diradiasi dengan sinar gamma dengan sumber radiasi dari ⁶⁰Co.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Jamur *Pleurotus sajor-caju* dan *Pleurotus floridae*, alkohol, ⁶⁰Co, *potato dextrose agar* (PDA), *potato dextrose broth* (PDB), dapar gel, dapar pengekstrak, pati kentang, pasir kuarsa, bromofenol biru, kertas saring, pewarna isozim esterase, fosfatase asam, dehidrogenase malat, dan perekat.

METODE. Transfer miselia jamur sebelum diradiasi dilakukan dengan pemotongan medium agar yang ditumbuhi miselia stok jamur *P. sajor-caju* dan *P. floridae* sebesar 0,5 x 0,5 cm dengan spatel. Spatel terlebih dahulu direndam dalam alkohol dan sisa-sisa alkohol pada spatel dikeringkan dengan pembakaran api Bunsen. Potongan miselia diletakkan terbalik di bagian tengah medium yang telah mengeras. Bagian tepi cawan diisolasi dengan plastik perekat dan cawan diberi label yang terdiri atas jenis jamur, tanggal transfer, dan dosis radiasi yang akan diberikan.

Sebelum dan sesudah radiasi dilakukan pengamatan diameter koloni untuk memeriksa laju pertumbuhan miselia akibat radiasi.

Radiasi dilakukan pada kultur jamur yang telah menempati satu pertiga medium PDA dengan sinar gamma ⁶⁰Co dosis 0 kGy (kontrol), 1 Kgy, 3 Kgy, dan 5 Kgy pada radiasi pendahuluan. Radiasi selanjutnya dilakukan dengan dosis 0 Kgy, 0,25 kGy, 0,5 kGy, 0,75 kGy dan 1 kGy. Biakan hasil radiasi disubkultur ke dalam medium PDA untuk stok. Biakan juga disubkultur pada media PDB untuk perbanyakan miselia.

Lima buah potongan miselia dimasukkan ke dalam medium PDB yang suhunya telah sama dengan suhu kamar. Mulut labu disumbat kapas dan diisolasi dengan plastik perekat. Label yang terdiri atas jenis jamur, tanggal subkultur, dan dosis radiasi yang telah diberikan, direkatkan pada permukaan labu. Kultur kemudian digoyang dengan *shaker* berkecepatan 100 rpm selama 2 minggu.

Kultur jamur yang telah diradiasi diperbanyak dengan melakukan transfer ke dalam medium baru. Setelah tumbuh memenuhi medium, miselia dipisahkan dari medium dengan pengerokan. Miselia yang telah diperoleh dibekukan dalam nitrogen cair selama 2 hingga 3 menit, kemudian dikeringbekukan selama 16 jam. Pelet hasil pengeringan beku dihaluskan dalam lumpang hingga diperoleh bubuk halus seberat 10 mg untuk masing-masing dosis dan jenis jamur.

Gel pati dibuat dengan melarutkan 20 g pati kentang ke dalam kurang lebih sepertiga bagian dari 200 ml dapar gel. Selanjutnya gel pati diproses sesuai dengan prosedur yang dilakukan oleh Hartana⁽⁶⁾.

Selanjutnya, bubuk jamur dimasukkan ke dalam lumpang yang berbeda dalam jumlah yang seimbang untuk masing-masing dosis. Ekstraksi enzim dilakukan dengan menggerus bubuk jamur bersama dengan dapar pengekstrak dan pasir kuarsa. Setelah halus, kertas saring berukuran 0,5 x 0,5 cm dimasukkan ke dalam lumpang dan didiamkan beberapa saat hingga ekstrak enzim meresap⁽⁶⁾.

Dalam pelaksanaan elektroforesis enzim pada gel pati, kertas saring disisipkan ke dalam sumur gel dengan bantuan pinset. Pada sumur 1, disisipkan kertas saring yang telah direndam dalam bromofenol biru sebagai penanda jalannya elektroforesis. Pada sumur yang lain, disisipkan kertas saring yang berisi ekstrak enzim. Gel kemudian dimasukkan ke dalam alat yang berisi dapar elektroda setelah selotip dari kaki cetakan gel dibuka. Selanjutnya alat dihubungkan ke sumber listrik dan elektroforesis dijalankan dengan tegangan 100 volt selama 4 jam pada suhu 5°C. Setelah elektroforesis selesai, gel dikeluarkan dari cetakan dan dipotong menjadi 4 bagian horisontal dengan bantuan alat pemotong. Selanjutnya, gel dikeringkan dan didokumentasikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Radiasi dilakukan dengan penembakan sinar gamma yang berasal dari ^{60}Co terhadap biakan jamur pada medium PDA. Menurut Esser, teknik yang paling menguntungkan dalam melakukan radiasi pada jamur adalah dengan meradiasi biakan jamur pada media agar⁽³⁾. Teknik tersebut lebih efektif dalam menghasilkan mutan dengan frekuensi yang besar. Selain itu, teknik tersebut juga mempercepat berlangsungnya radiasi, dan memudahkan dalam melakukan pengamatan perubahan morfologi pasca radiasi.

Penelitian pendahuluan telah dilakukan terhadap ketiga jenis jamur tersebut dengan dosis 1 kGy, 3 kGy dan 5 kGy. Namun, pengamatan pasca radiasi menunjukkan pertumbuhan yang sangat terhambat bahkan berhenti sama sekali setelah beberapa waktu

lamanya. Semakin besar dosis radiasi, semakin banyak pula energi yang diterima oleh sel, yang menyebabkan semakin banyak radikal bebas air terbentuk akibat eksitasi elektron-elektron air dalam sel. Kemampuan sel untuk memperbaiki kerusakan-kerusakan tersebut semakin rendah karena sel menerima dosis yang besar dalam waktu yang singkat (detik, menit, atau jam) atau dosis akut. Akibatnya terjadi penghambatan pertumbuhan bahkan kematian biakan⁽⁷⁾.

Berdasarkan hasil radiasi pendahuluan, maka dosis radiasi pada penelitian yang dilakukan diturunkan menjadi 0 kGy (kontrol), 0,25 kGy, 0,5 kGy, 0,75 kGy, dan 1 kGy. Pengamatan pasca radiasi menunjukkan tidak adanya kemunduran pertumbuhan atau kematian pada biakan dengan dosis yang telah diturunkan (Tabel 1, 2 & 3). Tampak pula adanya perubahan warna koloni menjadi kecoklatan pada

Tabel 1. Pertumbuhan jamur tiram putih (*Pleurotus floridae*) pada medium PDA sebelum dan pasca radiasi*

HSR (Hari sesudah radiasi)	Diameter (cm)				
	Kontrol	0,25 Kgy	0,5 KGy	0,75 KGy	1,0 Kgy
-1	5,2	5,3	5,8	4,9	4,6
2	7,6	7,8	8,2	5,7	5,0
4	9,9	9,3	10,8	9,0	7,6

Keterangan: * sampel diambil yang mewakili

Tabel 2. Pertumbuhan jamur tiram abu-abu (*Pleurotus sajor-caju*) pada medium PDA sebelum dan pasca radiasi*

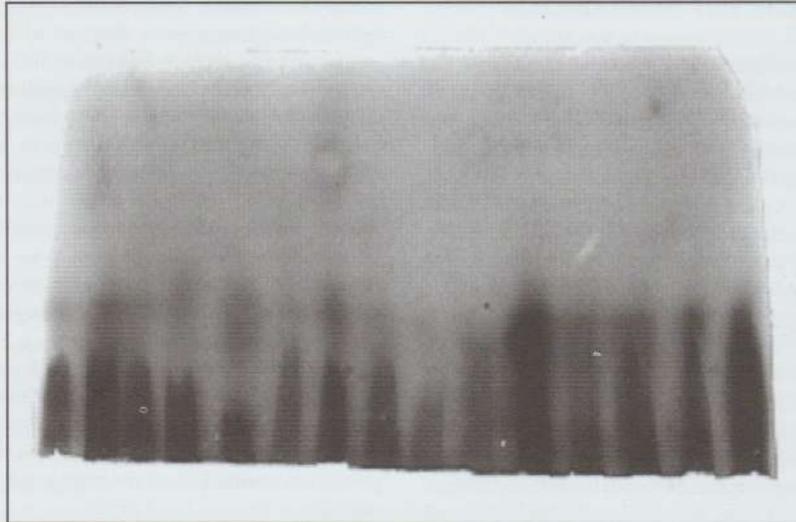
HSR (Hari sesudah radiasi)	Diameter (cm)				
	Kontrol	0,25 Kgy	0,5 Kgy	0,75 KGy	1,0 Kgy
-1	4,3	4,9	5,3	5,5	3,9
2	7,0	7,3	7,8	8,2	6,8
4	9,3	10,4	9,1	9,8	8,1

Keterangan: * sampel diambil yang mewakili

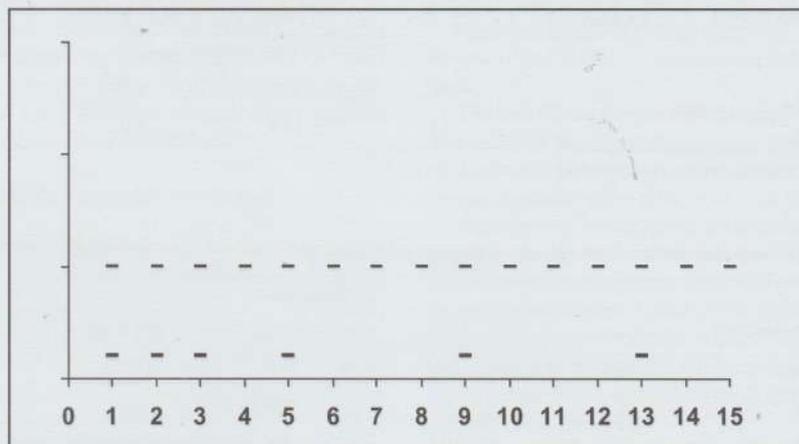
Tabel 3. Pertumbuhan jamur tiram coklat (*Pleurotus cystidiosus*) pada medium PDA sebelum dan pasca radiasi*

HSR (Hari sesudah radiasi)	Diameter (cm)				
	Kontrol	0,25 Kgy	0,5 KGy	0,75 KGy	1,0 Kgy
-1	6,4	6,5	6,8	7,0	6,8
2	8,6	9,1	9,2	9,8	9,2
4	12	10,8	11,4	12,2	11,6

Keterangan: * sampel diambil yang mewakili



Gambar 1. Gel pati dengan pewarnaan esterase.



Gambar 2. Skema zimogram esterase. 1) PC 1 kGy; 2) PC 0,75 kGy; 3) PC 0,5 kGy; 4) PC 0,25 kGy; 5) PC 0 kGy; 6) PSC 1 kGy; 7) PSC 0,75 kGy; 8) PSC 0,5 kGy; 9) PSC 0,25 kGy; 10) PSC 0 kGy; 11) PF 1 kGy; 12) PF 0,75 kGy; 13) PF 0,5 kGy; 14) PF 0,25 kGy; 15) PF 0 kGy.

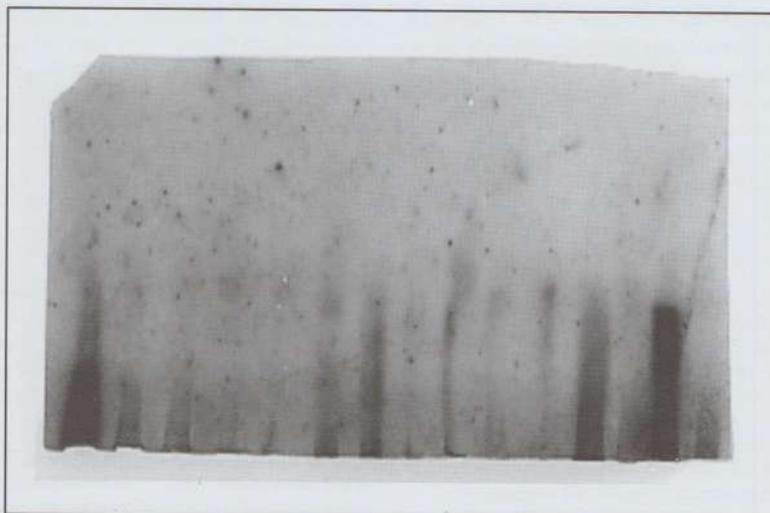
biakan jamur yang diradiasi dengan dosis 0,75 kGy.

Subkultur jamur dilakukan pada medium PDB untuk memudahkan pemanenan hifa yang akan dianalisis. Setelah diperoleh jumlah hifa yang memadai, sampel jamur terlebih dahulu direndam dalam nitrogen cair dan diberi perlakuan kering beku.

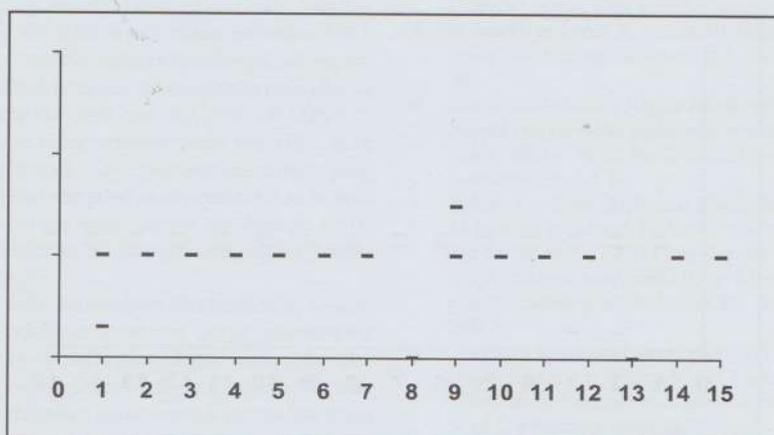
Tujuan dari perlakuan tersebut adalah untuk menghentikan pertumbuhan dan metabolisme biakan, serta mengeringkan sel sehingga lebih mudah untuk dihaluskan lebih lanjut^(8,9). Selain itu, perlakuan

pengeringan tersebut tidak menimbulkan panas yang dapat menyebabkan rusaknya konformasi protein enzim di dalam jaringan⁽¹⁰⁾.

Pada penelitian ini, pewarna isozim yang digunakan adalah untuk esterase (EST), fosfatase asam (ACP) dan dehidrogenase malat (MDH). Pemilihan isozim tersebut didasarkan pada penelitian isozim jamur dan pewarnaan yang biasa dilakukan untuk analisis isozim tanaman^(11,12). Hal ini didasarkan pada perkiraan bahwa jamur yang bertumbuh buah



Gambar 3. Gel pati dengan pewarnaan fosfatase asam.



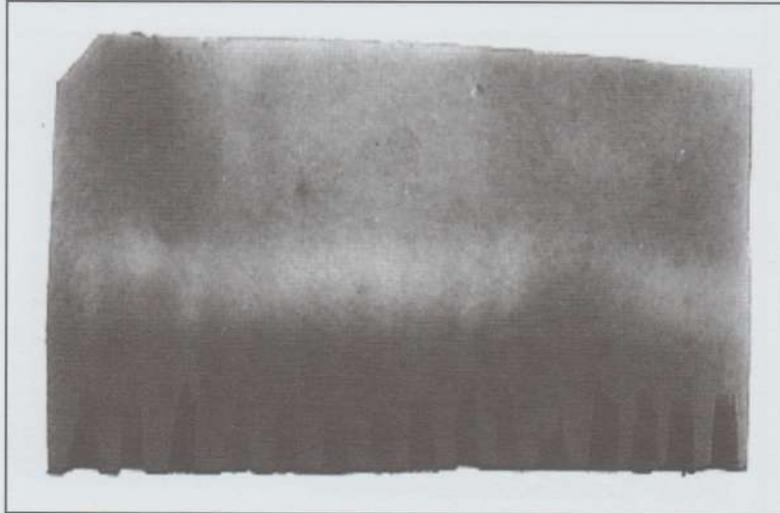
Gambar 4. Skema zimogram fosfatase asam. 1) PC 1 kGy; 2) PC 0,75 kGy; 3) PC 0,5 kGy; 4) PC 0,25 kGy; 5. PC 0 kGy; 6) PSC 1 kGy; 7) PSC 0,75 kGy; 8) PSC 0,5 kGy; 9) PSC 0,25 kGy; 10) PSC 0 kGy; 11) PF 1 kGy; 12) PF 0,75 kGy; 13) PF 0,5 kGy; 14) PF 0,25 kGy; 15) PF 0 kGy

besar mempunyai sifat dan metabolisme yang lebih mirip dengan tanaman.

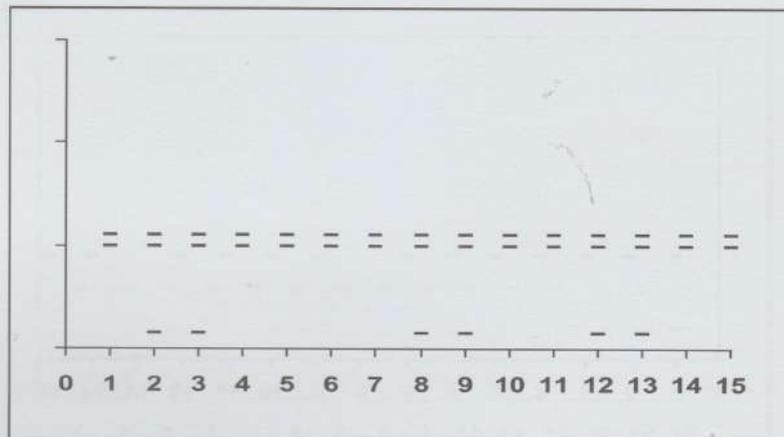
Hasil analisis isozim dalam bentuk zimogram yang ditunjukkan oleh gambar gel pati yang diwarnai (Gambar 1, 3 dan 5) yang diperjelas dengan diagram zimogram (Gambar 2, 4 dan 6) secara garis besar menunjukkan terjadinya mutasi yang ditandai dengan adanya perbedaan (pertambahan atau pengurangan garis) jika dibandingkan dengan kontrol.

Pada jamur tiram *Pleurotus cystiditiosus* (PC),

esterase merupakan enzim dari satu rantai polipeptida (monomerik) yang dihasilkan oleh 2 alel (heterozigot). Dosis radiasi 0,5 kGy, 0,75 kGy, dan 1 kGy menyebabkan mutasi pada alel daerah pengatur produksi esterase sehingga terjadi perubahan pada produksi enzim saja⁽¹³⁾. Pada mutan PC 0,25 kGy, mutasi menyebabkan salah satu alel tidak lagi menghasilkan esterase. Alel tersebut mengalami *null mutation*, yaitu tidak dihasilkannya enzim (protein) akibat mutasi yang berlangsung pada situs DNA



Gambar 3. a. Gel pati dengan pewarnaan dehidrogenase malat.



Gambar 6. Skema zimogram dehidrogenase malat. 1) PC 1 kGy; 2) PC 0,75 kGy; 3) PC 0,5 kGy; 4) PC 0,25 kGy; 5) PC 0 kGy; 6) PSC 1 kGy; 7) PSC 0,75 kGy; 8) PSC 0,5 kGy; 9) PSC 0,25 kGy; 10) PSC 0 kGy; 11) PF 1 kGy; 12) PF 0,75 kGy; 13) PF 0,5 kGy; 14) PF 0,25 kGy; 15) PF 0 kGy.

pengontrol aktivitas protein enzim⁽¹³⁾.

Fosfatase asam dan dehidrogenase malat merupakan enzim yang bersifat monomerik homozigotik, sehingga hanya satu pita yang terbentuk pada zimogram kontrol⁽²⁾. Mutasi 0,5 kG dan 0,75 kGy pada PC menyebabkan terbentuknya 2 isozim pada dehidrogenase malat. Demikian pula untuk mutasi 1 kGy pada fosfatase asam. Isozim dapat terbentuk akibat perbedaan satu asam amino saja dari rantai polipeptida penyusun enzim yang

dikode oleh salah satu alelnya⁽¹⁰⁾. Dengan demikian, pada alel yang dimaksud, terjadi mutasi *missense* yang menyebabkan perubahan asam amino⁽¹³⁾.

Pada jamur *Pleurotus sajor-caju* (PSC), mutasi secara konsisten terjadi pada dosis 0,25 kGy untuk setiap sistem enzim. Dosis tersebut menyebabkan terbentuknya 2 isozim untuk ketiga sistem enzim yang dianalisa. Terbentuknya 2 isozim juga terjadi pada dosis 0,5 kGy untuk enzim dehidrogenase malat. Sedangkan untuk enzim fosfatase asam, dosis 0,5

kGy menyebabkan terbentuknya *null mutation*. Tanpa enzim fosfatase asam, mutan tersebut dapat tetap karena mungkin enzim tersebut bukan merupakan enzim yang esensial bagi kelangsungan hidup jamur tiram⁽¹³⁾. Selain itu, biakan mutan juga dipelihara dalam kondisi yang sangat mendukung pertumbuhannya, tanpa tekanan dari lingkungan.

Jamur *Pleurotus floridae* (PF) mengalami mutasi yang konsisten pada dosis 0,5 kGy untuk setiap sistem enzim. Pada enzim fosfatase asam dosis tersebut menyebabkan terbentuknya *null mutation*. Sedangkan pada enzim esterase dan dehidrogenase malat, dosis tersebut menyebabkan terbentuknya 2 pita isozim. Hal tersebut berbeda dengan pita kontrol yang bersifat monomerik homozigot. Terbentuknya pola pita isozim yang berbeda dengan kontrol juga terjadi pada PF yang diradiasi dengan dosis 0,75 kGy. Sedangkan pada radiasi PF dengan dosis 0,25 kGy, alel fosfatase asam mengalami mutasi sehingga menghasilkan lebih banyak enzim tersebut.

Pada beberapa individu, sinar gamma tidak menunjukkan terbentuknya mutasi. Hal tersebut disebabkan oleh adanya mekanisme perbaikan DNA pada jamur. Lemontt melaporkan adanya mekanisme perbaikan DNA terhadap radiasi gamma pada khamir yang dikontrol oleh gen RAD50—RAD57⁽¹⁴⁾. Mutasi juga tidak tampak pada individu yang mengalami mutasi *silent*, yaitu perubahan basa yang tidak menyebabkan perubahan pembentukan protein enzim. Beberapa asam amino pembentuk rantai protein memiliki lebih dari satu triplet kodon pengkodennya⁽¹³⁾.

Salah satu kelemahan elektroforesis isozim adalah ketidakmampuannya untuk mendeteksi seluruh variasi genetik pada tingkat nukleotida. Hanya sekitar sepertiga bagian dari substitusi nukleotida yang terekspresikan dalam bentuk perubahan asam amino. Perubahan asam amino tersebut pun hanya dapat terdeteksi hingga sebesar 25% saja⁽¹²⁾. Selain itu, diperlukan lebih banyak analisis sistem enzim untuk dapat mendeteksi setiap perubahan tersebut.

Dengan segala kelemahannya, analisis isozim telah dapat membantu untuk mendeteksi secara dini terjadi atau tidaknya mutasi sehingga pengamatan selanjutnya dapat dipermudah hanya dengan mengkonsentrasikan pada mutan-mutan saja.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dosis radiasi yang tidak membunuh miselia jamur tiram yang dapat digunakan sesuai kondisi yang sama dengan penelitian ini adalah 0,25 KGy, 0,5 KGy, 0,75

KGy dan 1 KGy. Analisis isozim dapat dilakukan untuk mendeteksi terjadi atau tidaknya mutasi pada fase yang sangat dini, dalam hal ini miselia. Adapun enzim-enzim yang dapat digunakan sebagai marka adalah esterase, fosfatase asam dan dehidrogenase malat. Penelitian ini layak dilanjutkan untuk melihat fenotipe akibat mutasi pada pertumbuhan di lapangan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Djarajah NM dan Djarajah AB. Budidaya jamur tiram. Yogyakarta: Penerbit Kanisius; 2001. hal. 67.
2. Busby B. Radiation and radioactivity. diambil dari <http://www.physics.isu.edu/radinf.htm>. diakses 6 April, 2003.
3. Esser K. Application and importance of fungal genetics for industrial research. In: Radiation & radioisotopes for industrial microorganisms. Wina: IAEA; 1971.p. 83-91.
4. Slater R.J. Radioisotope technique. In: Wilson K and Walker J, editors. Principles and technique of practical biochemistry, 5th ed. Cambridge University Press; 2000. p. 687-728.
5. Holme DJ and Peck H. Analytical chemistry, 2nd ed. Burnt Mill: Longman Scientific & Technical; 1994. p. 507.
6. Hartana A. Pelatihan singkat teknik analisis dengan metode dan peralatan muktahir di bidang hayati dan kimia. Bogor: Pusat Studi Ilmu Hayati Lembaga Penelitian IPB; hal. 76.
7. Holmes JA, Gibbs LM, Strauss HW, Mitchell M, Goff JA and Casper G Part I: Biological effects of radiation and unit of dose. 1999; [4 hlm.]. diambil dari <http://www.stanford.edu/dept/EHS/prod/researchlab/radlaser/manual/part1/biological.htm>. diakses 4 Juni, 2003.
8. Simpkins I. General principles of biochemical investigations. In: Wilson K. and Walker J, editors. Principles and technique of practical biochemistry. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. p. 1-97.
9. SIUC (Southern Illinois University Carbondale). Starch gel electrophoresis of plant tissue. 2000. [4 hlm]. diambil dari <http://www.science.siu.edu/nickrent/PLB420/IsozymeTechniques>. diakses 8 Juni, 2003.
10. Walker J. Protein structure, purification & characterization. In: Wilson K and Walker J, editors. Principles and technique of practical biochemistry. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. p. 312-56.
11. Larraya LM, Perez G, Ritter E, Pisabarro AG and Ramirez G. Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 2000. 66 (12): 5290-300.
12. Orosina WJ, Chase TE and Cobb FE. Allozymes differentiation of intersterility group of *Herero-*

- busidion annosum* isolated from conifer in Western US. *Phytopathology* 1991.82 (5):540-45.
13. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC and Gelbart WM. An introduction to genetic analysis. XVII. New York: WH Freeman; 2000. p. 860.
 14. Lemont JF. Genetic and physiological factors affecting repair and mutagenesis in yeast. In: Generoso WM, Shelby MD and Deserres FJ, editors. DNA repair and mutagenesis in eukaryotes. New York: Plenum; 1980.p. 85-111.