

IDENTIFIKASI MOLEKULER SEBAGAI METODE TEPAT UNTUK KARAKTERISASI SPESIES *Trichoderma*

Elika Joeniarti

Fakultas Pertanian Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

jl. Dukuh Kupang XXV/54 Surabaya 60225

elika_joe@yahoo.co.id

ABSTRAK

Pemanfaatan *Trichoderma* secara komersial sebagai agensia pengendali hayati, harus didahului dengan identifikasi akurat, formulasi yang tepat, serta studi tentang sinergisme berbagai mekanisme antagonistiknya. Identifikasi *Trichoderma* lebih banyak didasarkan pada sifat morfologinya, yang mempunyai kesulitan tersendiri terkait dengan kemiripannya secara visual. Artikel ini menjelaskan tentang metode akurat untuk mengkarakterisasi spesies *Trichoderma*. Saat ini metode molekuler menjadi sebuah teknik penting dalam taksonomi jamur, dan telah diaplikasikan dalam taksonomi *Trichoderma*. Berbagai metode seperti analisis isozym, marker DNA, teknik fingerprinting berbasis PCR, serta sekuensing DNA, dapat digunakan untuk membedakan spesies *Trichoderma* dan mengklasifikasikannya ke dalam strain. Karakter molekuler juga diaplikasikan sebagai perangkat diagnosa dalam mengidentifikasi *Trichoderma* yang mempunyai kemampuan antagonistik tinggi.

Kata kunci: *Trichoderma*, molekuler, identifikasi

ABSTRACT. Molecular Identification as An Accurate Method to Characterize *Trichoderma* Species. The commercial use of *Trichoderma* as biocontrol agents must be preceded by precise identification, adequate formulation, and studies about the synergistic effects of their biocontrol mechanisms. Identification of *Trichoderma* is currently based largely on morphological characters. However, identification of *Trichoderma* isolates at the species level have proved difficult, due to the morphological similarities. This article describes the accurate methods to characterize of *Trichoderma* Species. Recently, molecular methods have been introduced into *Trichoderma* taxonomy and it is proved to be valuable tools in fungal taxonomy. Their application has led to the reconsideration of several genera. Isoenzyme analysis, DNA markers, PCR-fingerprinting, and DNA sequencing, have been used to distinguish *Trichoderma* species within specific groups of strain. Finally, molecular markers can be used as a diagnostic kit to identify a potential *Trichoderma* strain for its commercial application.

Key words: Trichoderma, molecular, identification

I. PENDAHULUAN

Pemanfaatan *Trichoderma* sebagai agensia pengendali hayati, merupakan salah satu alternatif penting untuk mengendalikan jamur penyebab penyakit tanaman tanpa menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan. Menurut Kubicek dan Harman (1998), penggunaan *Trichoderma* secara komersial harus didahului dengan identifikasi akurat, formulasi yang tepat, serta studi tentang sinergisme berbagai mekanisme antagonistiknya. Dikatakan oleh Siddiquee *et al.* (2007), bahwa sampai saat ini genus *Trichoderma* masih menjadi tantangan besar bagi para ahli sistematika, karena hubungan kekerabatan anggotanya yang tidak jelas. Pengaruh lingkungan terhadap karakter morfologi dan fisiologi kultur seringkali menyebabkan identifikasi yang akurat sulit dilakukan.

Deskripsi tentang spesies dalam genus *Trichoderma* memberikan kesulitan tersendiri karena adanya kemiripan morfologi antar spesies (Dodd *et al.*, 2000;

Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002; dan Siddiquee *et al.*, 2007). Ditambahkan oleh Bulat *et al.* (1998), bahwa kelemahan utama dari identifikasi morfologi adalah tidak dapat digunakan untuk membedakan strain dalam satu spesies maupun spesies dalam genus *Trichoderma*. Menurut Irina dan Kubicek (2005), sejauh ini kebanyakan anggota dari genus *Trichoderma* didefinisikan hanya berdasarkan karakter morfologi saja, sementara analisis sekuen gen hanya digunakan untuk konfirmasi atau sebagai pelengkap. Padahal, data molekuler tetap dibutuhkan untuk mengatasi kerancuan dalam karakterisasi tersebut (Kumar dan Sharma (2011) serta Dodd *et al.*, (2000). Ditambahkan, bahwa identifikasi *Trichoderma* saat ini harus dilakukan dengan menggunakan karakter morfologi, kultural, molekuler, dan biokimia, untuk mendapatkan spesies yang benar.

Dari uraian latar belakang tersebut, dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimanakah identifikasi yang tepat untuk spesies *Trichoderma*?
2. Bagaimanakah peranan metode molekuler dalam identifikasi spesies *Trichoderma*?

Urgensi dari permasalahan tersebut adalah:

1. Dapat diatasinya kerancuan tentang deskripsi spesies dalam genus *Trichoderma*.
2. Digunakanannya karakter molekuler sebagai kelengkapan (atribut) penting bagi *Trichoderma*, terutama dalam upaya pemanfaatannya sebagai agensia pengendali hayati yang potensial.

II. PEMBAHASAN

a. Karakter Morfologi untuk Prediksi Spesies *Trichoderma*

Genus *Trichoderma* pertama kali dikenal oleh Persoon pada tahun 1791-1794 di Jerman, dengan ditemukannya empat spesies jamur tersebut. Selanjutnya pada tahun 1927 Gilman dan Abbott mengidentifikasinya berdasarkan bentuk

dan warna konidia serta warna koloni, sebagai *T. lignorum* (= *T. viride*) karena konidianya berbentuk bulat dan *T. koningii* karena konidianya lonjong (Mohiddin *et al.*, 2010). Sampai dengan tahun 1969 hampir semua strain *Trichoderma* diidentifikasi sebagai *T. viride* yang menghasilkan enzim selulase, oleh karena itu Kubicek dan Samuels (tidak dipublikasikan) menyatakan bahwa semua identifikasi *Trichoderma* yang dilakukan sebelum tahun 1969 dinyatakan tidak benar (Irina dan Kubicek, 2005).

Rifai (1969) menggunakan konsep “agregat spesies” dan membedakan sembilan agregat tersebut berdasarkan karakter morfologi seperti percabangan konidiofor, disposisi phialida, dan bentuk konidia. Sembilan agregat spesies yang dimaksud adalah *T. harzianum* Rifai., *T. longibrachiatum* Rifai., *T. aureoviride* Rifai., *T. koningii* Oud., *T. pseudokoningii* Rifai., *T. viride* Pers. ex S.F. Gray., *T. polysporum* (Link ex Pers.), dan *T. hamatum* (Bon.), serta *T. piluliferum*

Webster. Selanjutnya Bisset (1991) melengkapi konsep Rifai dengan menambah beberapa karakter morfologi yang lebih detail dan mengadopsi beberapa bentuk yang sebelumnya termasuk *Gliocladium*. Dia juga menetapkan dan membagi sebuah subdivisio menjadi lima seksion, yaitu: *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma*, *Saturnisporum*, dan *Hypocreanum*. Dengan demikian Bisset meningkatkan konsep agregat spesies ke level seksion. *Trichoderma* diklasifikasikan ke dalam kingdom *Myceteae*, divisio *Amastigomycota*, kelas *Deuteromycetes*, ordo *Moniliales*, famili *Moniliceae*, dan genus *Trichoderma* (Alexopolous dan Mims, 1979).

Deskripsi tentang spesies dalam genus *Trichoderma* memberikan kesulitan tersendiri karena adanya kemiripan morfologi antar spesies (Dodd *et al.*, 2000; Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002; dan Siddiquee *et al.*, 2007). Menurut Irina dan Kubicek (2005), identifikasi spesies baru

sebaiknya dilakukan melalui analisis GCPSR (*Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition*), yang memerlukan analisis tentang beberapa gen-*unlinked*. Analisis ini mengimplikasikan adanya harmonisasi posisi filogenetik yang benar dari suatu spesies dan tidak tumpang-tindih dengan yang lain. Ini merupakan konsep alternatif yang atraktif untuk melengkapi konsep MSR (*Morphological Species Recognition*). Meskipun memberikan hasil identifikasi yang akurat, analisis GCPSR belum banyak dilakukan oleh para ahli taksonomi *Trichoderma* karena memerlukan waktu dan biaya yang besar.

Samuels (1996, dalam Irina dan Kubicek, 2005) melakukan identifikasi *Trichoderma* melalui analisis morfologi disertai fisiologi, yang menggunakan perbedaan laju pertumbuhan *Trichoderma* pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan SNA (*Synthetischer Nährstoffarmer Agar*). Dikatakan bahwa penggunaan metode tersebut tidak mahal dan mudah

dilakukan. Sementara itu Bisset (tidak dipublikasikan, dalam Irina dan Kubicek, 2005), mengenalkan metode fenetik yang mendasarkan pada analisis penghitungan asimilasi karbon. Dikatakan oleh Kubicek *et al.*, (2003), bahwa analisis ini sejatinya tidak cocok untuk taksonomi *Trichoderma*, terkait banyaknya variasi strain dalam spesies tersebut. Meskipun demikian Irina dan Kubicek (2005) menggunakan analisis ini untuk melengkapi identifikasi dengan GCPSR.

Saat ini *Trichoderma* ditempatkan sebagai genus jamur yang paling banyak diteliti taksonominya. Hal tersebut ditunjukkan dengan ditemukan atau diketahuinya sekuens minimal dua gen dalam identifikasi tiap spesies. Meskipun demikian, sampai saat ini tidak ada analisis filogenetik yang lengkap karena keterbatasan informasi tentang sekuens gen yang dianalisis. Dengan kata lain informasi tentang sekuens gen baru sangatlah diperlukan, karena tidak ada gen tunggal yang bersifat *universal* untuk

analisis filogenetik genus *Trichoderma* (Irina dan Kubicek, 2005).

b. Peranan Metode Molekuler dalam Identifikasi Spesies *Trichoderma*

Beberapa tahun terakhir ini, berbagai metode molekuler telah digunakan dalam sistematika dan filogenetik jamur. Teknik molekuler terbukti menjadi alat yang berharga dalam taksonomi jamur dan berperan penting dalam mengingat kembali beberapa genus yang terlewatkan (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002; serta Siddiquee *et al.*, 2007). Teknik molekuler telah dikenalkan dalam taksonomi *Trichoderma* dengan perbaikan pada seksion *Longibrachiatum* dan *Trichoderma* serta beberapa teleomorph yang terkait. Dikatakan oleh Kubicek dan Harman (1998), bahwa data DNA yang merefleksikan genotip suatu organisme, dapat menunjukkan hubungan kekerabatan yang lebih jelas daripada karakter morfologi.

Pendekatan molekuler seperti analisis isozym, hibridisasi DNA-DNA, DNA-fingerprinting RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), PCR based-fingerprinting seperti RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), UP-PCR (*Universal Primer-Polymerase Chain Reaction*), AP-PCR (*Arbitrary Primer*), M_{13} (*microsatellite*), serta DNA-sequencing, telah digunakan untuk mempelajari kekerabatan spesies dalam genus *Trichoderma* (Lee dan Hseu, 2002). Dikatakan oleh Dodd dan Stewart (2003), berbagai metode molekuler tersebut dapat memberikan karakter tambahan yang sangat bernilai, sehingga dapat membedakan jamur filamentous pada level spesies dan strain. Sementara Cumagun *et al.* (1998) menyatakan, identifikasi yang tepat tentang *Trichoderma* menjadi hal penting terkait dengan meningkatnya pemanfaatan jamur tersebut sebagai agensia pengendali hayati terhadap patogen tanaman.

Setiap marker molekuler memiliki teknik yang berbeda-beda baik dalam hal jumlah DNA yang dibutuhkan, dana, waktu, prosedur pelaksanaan, tingkatan polimorfisme dan pengujian secara statistik (Garcia *et al.*, 2004). Berikut ini adalah beberapa jenis marker molekuler yang sering dipakai dalam berbagai analisis genetik:

1. Marker Protein (Analisis Isozym)

Salah satu metode molekuler yang sering dilakukan untuk identifikasi variasi genetik adalah analisis isozym. Karakterisasi *Trichoderma* menggunakan metode ini pertama kali dilakukan oleh Zamir dan Chet (1985), yang mengklasifikasikan 23 isolat *T. harzianum* ke dalam lima golongan, berdasarkan profil isozymnya.

Analisis isozym merupakan metode untuk mempelajari taksonomi, genetik, dan populasi suatu organisme. Metode ini telah digunakan untuk identifikasi keragaman genetik pada bakteri, jamur, tumbuhan, dan beberapa jenis binatang. Kelebihan

metode ini adalah mudah dilakukan, biaya murah, dan memerlukan waktu singkat.

DNA based-method dapat memberikan keragaman polymorphisme yang tinggi disertai resolusi yang lebih besar, namun dalam kondisi keragaman genetik yang rendah maka analisis isozym dapat memberikan jawaban terhadap masalah biologi yang lebih cepat, lebih mudah, dan lebih murah.

Isozym adalah suatu enzim yang mempunyai beragam bentuk tetapi aktivitas katalitiknya sama. Perbedaan bentuk tersebut dihasilkan dari mutasi poin yang menyebabkan perubahan satu asam amino pada sisi non katalitik, sehingga menghasilkan protein atau enzim yang berbeda profil fisiknya. Pada akhirnya perubahan asam amino tersebut mempengaruhi muatan atau ukuran enzim. Dengan elektroforesis perubahan ini dapat dideteksi. Inilah dasar dikembangkannya analisis isozym.

2. Marker DNA

a. *DNA-fingerprinting (RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphisms)*

DNA-fingerprinting merupakan teknik molekuler baru yang memberikan revolusi pada dunia forensik. Metode ini pertamakali dikembangkan di Inggris tahun 1985, dengan dasar pemikiran bahwa setiap individu mempunyai pola DNA yang unik. Pola DNA dihasilkan dari pemotongan DNA pada sekuens spesifik yang dikenali oleh enzim restriksi, sehingga dihasilkan banyak fragmen dengan ukuran yang berbeda. Selanjutnya fragmen DNA tersebut dielektroforesis dan sekuens spesifik dikenali melalui hibridisasi menggunakan probe radioaktif. Semakin dekat kekerabatan dua organisme, maka pola RFLP-nya pun semakin mirip. Keunggulan metode RFLP adalah mudah dilakukan dan hasilnya dapat dilihat dengan sangat cepat.

Meyer *et al.* (1992) menggunakan metode ini untuk mengidentifikasi sembilan agregat spesies *Trichoderma* dan mengenali lima section *Trichoderma*.

b. PCR-based fingerprinting

PCR adalah suatu (proses amplifikasi sekuens spesifik DNA secara *in-vitro*). Ada lima komponen utama PCR yaitu oligonukleotida primer, *buffer amplifikasi*, *deoxyribonucleoside triphosphates* (dNTP), sekuens target (*template* DNA) dan enzim *Taq DNA polimerase*. Dalam analisis keragaman, hal penting yang perlu diperhatikan adalah pemilihan primer yang dapat menampilkan polimorfisme pita DNA antar individu yang diuji, serta kualitas pita DNA untuk memudahkan dalam interpretasi data (Fatchiyah, 2008). Dijelaskan, bahwa keunggulan metode PCR yaitu dapat meningkatkan jumlah urutan basa nukleotida ribuan bahkan jutaan kali dari jumlah semula. Setiap urutan basa nukleotida yang diamplifikasi akan menjadi dua kali jumlahnya. Pada setiap siklus PCR akan diperoleh 2^n kali banyaknya DNA target. Kunci utama pengembangan PCR adalah menemukan bagaimana cara amplifikasi hanya pada

urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non-target. Pada umumnya PCR dilakukan dengan mengulangi reaksi pelipatgandaan sebanyak 20-30 siklus. Banyaknya siklus yang diperlukan terutama tergantung pada konsentrasi awal molekul DNA target yang akan dilipatgandakan. Siklus yang terlalu banyak justru akan meningkatkan konsentrasi produk yang tidak spesifik, sedangkan siklus yang terlalu sedikit akan mengurangi kuantitas produk yang diharapkan.

PCR telah menjadi metode tepat untuk mendeteksi mikroba tertentu dalam lingkungannya (Bulat *et al.*, 2000). Dikatakan bahwa berbagai upaya telah dilakukan untuk mengembangkan primer yang mengenali spesies spesifik. Mikroba yang telah dimodifikasi genetiknya pun dapat dikenali dengan PCR, karena sekuens asing yang terkandung akan berbeda dengan *wild type*-nya. PCR juga dapat digunakan untuk mengenali strain *wild-type* jika sekuens spesifiknya dapat

diidentifikasi. Dengan demikian teknik PCR dapat digunakan untuk menganalisa suatu mikroba tanpa harus mengkulturkannya.

PCR-based fingerprinting telah digunakan secara luas untuk karakterisasi spesies dan strain *Trichoderma*. Salah satu metode yang termasuk dalam teknik ini adalah RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), yaitu metode efektif untuk memperbanyak sekuen DNA spesifik secara in-vitro. Teknik PCR ini memanfaatkan dua sifat utama DNA, yaitu komplementasi basa dan anti paralelisme dari kedua rantai DNA-nya. Amplifikasi DNA dengan PCR secara teknis dapat memberikan keuntungan dibandingkan metode lain. Untuk mendapatkan karakterisasi sampel, metode ini dapat dikatakan sederhana, cepat dan akurat.

Marker RAPD dilakukan dengan mengamplifikasi DNA secara *random primer*. Adanya polimorfisme DNA dapat dideteksi dengan sinar ultraviolet setelah sebelumnya gel elektroforesis

diberi Etidhium Bromida (EtBr) sehingga dapat menimbulkan pendaran. Semakin banyak jenis primer yang digunakan akan menambah besar kemampuan mendeteksi perubahan yang kecil dan pasangan basa DNA genom (Ishak, 1998). Beberapa kelebihan dari teknik analisa RAPD ialah mudah dilakukan, memerlukan waktu singkat dalam menganalisa data, membutuhkan sampel DNA dalam jumlah sedikit, tidak memerlukan radioisotop, serta tidak memerlukan informasi sekuens DNA terlebih dulu (Demeke dan Adam, 1994; Yu dan Pauls, 1994; serta Bustaman dan Moeljopawiro, 1998). Sedangkan kelemahan dari teknik RAPD adalah menghasilkan data yang tidak spesifik dan tidak selalu *reproducible*, serta tidak dapat mendeteksi perubahan yang kecil pada DNA kecuali jika menggunakan lebih dari 500 jenis primer (Schmidt *et al.*, 1993, dalam Ishak, 1998).

Metode RAPD sudah banyak digunakan untuk identifikasi dan analisis keragaman genetik dalam *Trichoderma*,

dengan melihat polimorfisme DNA pada level spesies dan strain. Karakterisasi ini umumnya digunakan pula untuk penggolongan kemampuan antagonistik *Trichoderma* terhadap jamur patogen (Castle *et al.*, 1998; Goes *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2010).

Metode lain dari PCR-based fingerprinting adalah *UP (Universal Primer)-PCR*, yaitu teknik amplifikasi *multisite-DNA* dengan menggunakan design primer yang unik tanpa harus mengetahui terlebih dahulu sekuen DNA-nya (Cumagun *et al.*, 1998, Bulat *et al.*, 2000 dan Chaparro *et al.*, 2011). Dikatakan oleh Dodd dan Stewart (2003), bahwa selain bermanfaat untuk identifikasi jamur, *UP-PCR* juga dapat digunakan untuk mengetahui heterogenitas genetik jamur dan membedakan antar strain dalam spesies yang sama.

Menurut Lubeck dan Jensen (2010), analisis *UP-PCR* digunakan untuk mengkarakterisasi strain *Trichoderma* spp., yang menjadi bahan aktif produk

komersial biofungisida. Beberapa primer *UP* dapat menghasilkan *fingerprint* yang berbeda dan *reproducible* untuk setiap strain, sehingga dapat dibedakan dengan strain lainnya. Beberapa keunggulan *UP-PCR* dibandingkan dengan *RAPD* adalah: (i) menggunakan suhu *annealing* yang relatif tinggi, 52-55°C, (ii) ukuran primer cukup panjang tersusun atas 17 nukleotida, (iii) lebih *reproducible* dibandingkan metode *RAPD*, dan (iv) menghasilkan *fingerprint* yang memudahkan identifikasi marker spesifik.

Dodd dan Stewart (2003) menggunakan *UP-PCR* sebagai salah satu metode yang digunakan untuk membedakan isolat *Pithomyces chartarum*, agensia pengendali hayati patogen *Botrytis cinerea* pada tanaman anggur, dari isolat lainnya. Demikian pula Chaparro *et al.* (2011) yang menggunakan metode tersebut untuk mengetahui adanya perubahan genetik pada level DNA dari *Trichoderma* yang resisten terhadap fungisida *Captan*.

c. DNA-sequencing

Sampai saat ini ruas ITS merupakan bagian DNA jamur yang paling sering disekuensing dan berperan penting dalam mempelajari sistematika molekuler pada level inter- dan intraspecies (Kumar and Sharma, 2011). Disebutkan bahwa ruas ITS mempunyai variasi yang lebih beragam dibandingkan bagian genetik lain pada rDNA, oleh karena itu variasi masing-masing rDNA dalam ruas tersebut dapat diobservasi. Penggunaan metode sekuensing ITS untuk analisis filogenetik *Trichoderma* dapat memberikan data yang lebih informatif, sehingga dikatakan sebagai metode analisis filogenetik dan identifikasi jamur yang paling terpercaya.

Chakraborty *et al.* (2010) mengatakan, ruas ITS telah digunakan untuk menghasilkan primer spesifik yang dapat membedakan spesies jamur yang berkerabat dekat. Amplifikasi ruas ITS merupakan sebuah pendekatan dalam identifikasi molekuler, dengan menghasilkan produk berukuran 600

pasang basa. Ditambahkan oleh Kumar and Sharma (2011), bahwa analisis terhadap ruas ITS dapat digunakan sebagai paket diagnosis untuk mengidentifikasi *Trichoderma* yang potensial. Kindermann *et al.* (1998) merupakan orang pertama yang melakukan analisis filogenetik dalam genus *Trichoderma* dengan menggunakan analisis sekuen ruas ITS (*Internal Transcribed Spacer*) dari rDNA.

Gen rDNA mempunyai karakter yang sesuai untuk identifikasi jamur pada level spesies, karena sangat stabil dan *conserve*. Diketahui pula bahwa gen tersebut mempunyai banyak copy (sampai 200 copy), serta tersusun secara *tandem repeat*. Masing-masing repeat terdiri dari ribosom 5S, 18S, dan 28 S. Daerah ITS telah digunakan untuk menghasilkan primer spesifik yang dapat mendiferensiasikan spesies jamur yang berkerabat dekat. Dalam konteks yang lebih luas, amplifikasi daerah ITS dapat dijadikan sebagai suatu pendekatan dalam teknik identifikasi molekuler (Chakraborty

et al., 2010). Kelemahan dari metode molekuler ini adalah membutuhkan biaya yang mahal.

III. PENUTUP

a. Simpulan

1. Identifikasi yang tepat untuk spesies baru *Trichoderma* adalah dengan analisis GCPSR (*Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition*).
2. Identifikasi molekuler sebagai bagian dari analisis GCPSR, berperan penting dalam karakterisasi spesies *Trichoderma*.

b. Saran

Identifikasi morfologi sebaiknya hanya digunakan sebagai prediksi awal karakter *Trichoderma*, selanjutnya harus dilengkapi dengan identifikasi molekuler.

c. Implementasi

Pemilihan metode molekuler untuk identifikasi spesies baru *Trichoderma*, harus disesuaikan dengan ketersediaan

dana, waktu, dan pemahaman teknik (prosedur) pelaksanaan.

IV. DAFTAR PUSTAKA

- Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W. 1979. *Introductory of Mycology 3th Edition*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Bustaman, M dan Moeljopawiro, S. 1998. Pemanfaatan Teknologi Sidik Jari DNA di Bidang Pertanian. *Zuriat*. 9 (2):77-90.
- Bissett, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma* 2nd Edition. Infrageneric classification. *Can. J.Bot.* 69: 2357-2372.
- Bulat, S.A., Lubeck, M., Alekhina, I.A., Jensen, D.F., Knudsen, I.M.B., and Lubeck, P.S. 2000. Identification of a Universally Primed-PCR-Derived Sequence-Characterized Amplified Region Marker for an Antagonistic Strain of *Clonostachys rosea* and Development of a Strain-Specific PCR Detection Assay. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66, No.11: 4758-4763
- Chakraborty, B.N., Chakraborty, U., Dey, P.L., and Sunar, K. 2010. Phylogenetic Relationships of *Trichoderma harzianum* Based on the Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Region-1 of the rDNA. *Journal of Applied Sciences Research* 6(10): 1477-1482.
- Chaparro, A.P., Carvajal, L.H., and Orduz, S. 2011. Fungicide Tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T. harzianum* strains. *Agricultural Sciences*, Vol. 2, No. 3: 301-317.
- Cumagun, CJR., Hockenhull, J., and Lubeck, M. 1998. PCR-based Identification and Characterization of *Trichoderma* spp. for Rice Sheath Blight Disease Management in The Philippines.

International Congress of Plant Pathology
7th.

Demeke, T and Adams, R.P. 1994. *PCR Technology Current Innovation: The Use PCR RAPD Analysis in Plant Taxonomy and Evolution*. CRC Press. Inc.

Dodd, S.L., Crowhurst, R.N., Rodrigo, A.G., Samuel, G.J., Hill, R.A., and Stewart, A. 2000. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. *Mycol. Res.* 104 (1) : 23-34

Fatchiyah. 2008. *Amplifikasi DNA: Fungsi Dasar dan Aplikasinya*. Disampaikan pada Kursus Singkat Analisis Variabilitas Genetik Tanaman Menggunakan PCR (RAPD) Tanggal 19-20 Agustus 2008. Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya. Malang.

Garcia, A.A.F., Luciana, L., Benchimol, A.M.M., Barbosa, I.O., Geraldi, C.L. Souza Jr. and A.P. de Souza. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR Markers for Diversity Studies in Tropical Maize Inbred Lines. *Genetics and Molecular Biology* 27(4):579-588.

Irina, D. and Kubicek, C.P. 2005. Species concept and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? *Journal of Zhejiang University SCIENCE* 6B(2): 100-112.

Ishak. 1998. Identifikasi DNA Genom Mutan Padi Atomita-2 dan Tetuanya Menggunakan RAPD Markers. *Zuriat.* 9 (2):71-83.

Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuels, G.J., and Kubicek, C.P. 1998. Phylogeny of the Genus *Trichoderma* based on Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Region 1 of the rDNA Cluster. *Fungal Genetics and Biology* 24 : 298-309.

Kubicek, C.P. and Harman, G.E. 1998. *Trichoderma & Gliocladium*. Taylor & Francis Ltd.

Kullnig-Gradinger, C.M., Szakacs, G., and Kubicek, C.P. 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol Res* 106 (7): 757-767.

Kumar A. M. and Sharma, P. 2011. Molecular and morphological characters: An appurtenance for antagonism in *Trichoderma* spp. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10 (22): 4532-4543.

Lee, C-F. and Hse, T-H. 2002. Genetic relatedness of *Trichoderma* sect. *Pachybasium* species based on molecular approaches. *Canadian Journal of Microbiology* Vol.48 (9): 831-840.

Lübeck, M. and Jensen, D. F. 2002. Monitoring of Biocontrol Agents Based on *Trichoderma* Strains Following Their Application to Glasshouse Crops by Combining Dilution Plating with UP-PCR Fingerprinting. *Biocontrol Science and Technology* Vol.12, Issue 3.

Mohiddin, F.A., Khan, M.R., Khan, S.M., and Bhat, B.H. 2010. Why *Trichoderma* is Considered Super Hero (Super Fungus) Against the Evil Parasites? *Plant Pathology Journal* 9 (3): 92-102.

Panneerchelvam, S. and Norazmi, M.N. 2003. Forensic DNA Profiling and Database. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, Vol. 10, No. 2: 20-26.

Rifai, M.A. 1969. A Revision of the Genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 4: 116-142.

Siddiquee, S., Guan, F.A.T.S., and Aziz, E.R. 2007. Phylogenetic Relationships of *Trichoderma harzianum* Based on the Sequence Analysis of the Internall

Transcribed Spacer Region-1 of the rDNA.
Journal of Applied Sciences Research
3(9): 896-903.

Yu and K.P. Pauls. 1994. *PCR Technology
Current Innovation: Optimization of
DNA-Extraction and Procedures For*

RAPD Analysis in Plants. CRC Press
Inc.

Zamir, D. and Chet, I. 1985. Application
of enzyme electrophoresis for the
identification of isolates in *Trichoderma
harzianum*. *Can.J.Bot.* 31: 578-580.