

EKSPLORASI DAN IDENTIFIKASI *TRICHODERMA* ENDOFITIK PADA PISANG

Johanna Taribuka¹, Christanti Sumardiyono², SM Widyastuti³, & Arif Wibowo²

¹Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Pattimura
Jl. Martha Alfons, Kampus Poka-Ambon, 97233

²Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada
Jl. Flora 1, Bulaksumur, Yogyakarta, 55281

³Laboratorium Perlindungan dan Kesehatan Hutan Fakultas Kehutanan
Universitas Gadjah Mada Jl. Agro No.1 Bulaksumur, Yogyakarta, 55281
E-mail: anontari@yahoo.com

ABSTRACT

Exploration and identification of endophytic *Trichoderma* in banana. Endophytic fungi *Trichoderma* is an organism that can used as biocontrol agent. This study aims to isolate and identify endophytic *Trichoderma* in roots of healthy banana plants from three districts in Yogyakarta, which will be used as biological control agent against the pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Isolation was conducted using TSM (*Trichoderma Selective Medium*). We obtained six isolates of endophytic *Trichoderma* spp., i.e., Sw-1, Sw-2, Ksn, Psr-1, Psr-2, and Psr-3. Molecular identification was done by using ITS1 and ITS2 primer pair and sequenced. The sequence of DNA obtained was analysed and compared with NCBI database by using BLAST-N program. The results showed that all isolates were amplified at 560-bp. Phylogenetic analysis showed that isolates Sw-1, Sw-2 and Psr-1 are homologous to *Trichoderma harzianum*, isolate Ksn homologous to *Trichoderma asperillum*, isolate Psr-2 homologous to *Trichoderma gamsii*, and isolate Psr-3 homologous to *Trichoderma koningiopsis*, with the homologous value of 99%.

Key words: Identification, banana, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Trichoderma* endophytic

ABSTRAK

Eksplorasi dan Identifikasi *Trichoderma* Endofitik Pada Pisang. Jamur *Trichoderma* endofitik merupakan salah satu organisme yang dapat digunakan sebagai agens pengendali hayati. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi *Trichoderma* endofitik dari akar tanaman pisang sehat yang berasal dari tiga kabupaten di Provinsi DI Yogyakarta, yang akan digunakan sebagai agens pengendali hayati terhadap patogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* pada pisang. Isolasi menggunakan medium TSM (*Trichoderma Selective Medium*). Dari hasil isolasi diperoleh enam isolat *Trichoderma* spp. yaitu isolat Sw-1, Sw-2, Ksn, Psr-1, Psr-2, dan Psr-3. Identifikasi secara molekuler menggunakan Primer ITS1 dan ITS2, dilanjutkan dengan sekuensing. Hasil sekuensing dianalisis dan dibandingkan dengan database NCBI menggunakan program BLAST-N. Hasil PCR memperlihatkan bahwa semua isolat teramplifikasi pada 560-bp. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa isolat Sw-1, Sw-2 dan Psr-1 homolog dengan *Trichoderma harzianum*, isolat Ksn homolog dengan *Trichoderma asperillum*, isolat Psr-2 homolog dengan *Trichoderma gamsii*, dan isolat Psr-3 homolog dengan *Trichoderma koningiopsis*, dengan nilai homologi masing-masing sebesar 99%.

Kata kunci: Identifikasi, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, pisang, *Trichoderma* endofitik

PENDAHULUAN

Jamur endofitik merupakan mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan tanaman sehat tanpa menimbulkan gejala atau kerusakan pada inang (Tayung & Jha, 2010; Aly *et al.*, 2010). Jamur ini dapat diisolasi pada hampir semua bagian tanaman yang tumbuh di daerah tropis dengan iklim yang berbeda (Laran *et al.*, 2002). Jamur endofitik lebih banyak diperoleh dari isolasi

tanaman yang berada di lapangan dibanding tanaman yang ada di rumah kaca (Pimentel *et al.*, 2006).

Salah satu jamur endofitik yang sering ditemukan dan mampu berperan sebagai agens pengendali hayati yaitu *Trichoderma* spp. Jamur ini dapat menekan patogen penyebab penyakit pada tanaman terutama patogen terbawa tanah melalui mekanisme mikoparasitisme, kompetisi dan antibiosis serta secara langsung dapat juga memacu pertumbuhan tanaman dan merangsang respons

ketahanan terhadap penyakit (Widyastuti & Hariani, 2006; Soesanto *et al.*, 2011).

Trichoderma biasanya dianggap sebagai saprofit tanah, tetapi mampu berasosiasi dengan sistem perakaran tanaman, dan dikategorikan sebagai simbiosis (Harman *et al.*, 2004). Populasi mikroba endofitik terbesar pada kebanyakan tanaman adalah spesies *Trichoderma*, yang di antaranya teridentifikasi sebagai spesies baru (Hanada *et al.*, 2008; Samuels, 2006). Populasi *Trichoderma* endofitik tertinggi terdeteksi berada di dalam akar dan daun, dibandingkan di dalam batang dan buah, dan berpotensi sebagai antagonis (Sriwati *et al.*, 2011).

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh dan mengidentifikasi *Trichoderma* endofitik yang berada pada akar pisang budidaya sehat yang akan digunakan sebagai agens pengendali hayati terhadap penyakit layu fusarium pada pisang (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*). Identifikasi merupakan faktor penting dalam monitoring mikroorganisme yang digunakan di lapangan. Secara konvensional identifikasi sangat bergantung pada morfologi dan karakterisasi isolat, tetapi tidak semua jamur mampu menghasilkan spora, sehingga sulit dilakukan identifikasi hanya dengan menggunakan morfologi.

Kemajuan metode modern seperti *Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition* (GCPSR) dan sistem *DNA-barcode* merupakan metode yang dapat digunakan untuk identifikasi *Trichoderma* spp. di masa mendatang. Metode GCPSR digunakan untuk menganalisis hubungan gen, sedangkan sistem *DNA-barcode* didasarkan pada perbedaan nukleotida. Taylor *et al.* (2004) memanfaatkan konsep GCPSR untuk menganalisis lebih dari satu lokus gen, sehingga memberi kemudahan dalam taksonomi dan identifikasi *Trichoderma*. Druzhinina & Kubicek (2005) dan Druzhinina *et al.* (2006) telah meninjau konsep spesies dan keragaman biologi pada jamur *Trichoderma*, yang secara morfologi jamur ini sulit untuk dibedakan, namun klasifikasi filogenetiknya telah mencapai 100 spesies, dan diperkirakan akan meningkat secara konsisten.

Analisis sekuens *internal transcribed spacer region* 1 dan 2 (ITS1 dan ITS2) pada DNA ribosomal dapat membantu untuk deskripsi dan karakterisasi spesies pada genus *Trichoderma* (Ospina-Giraldo *et al.*, 1999; Jeewon *et al.*, 2013). Seluruh analisis tersebut menggunakan amplifikasi PCR karena dapat menghasilkan produk yang akurat, sehingga dapat digunakan dalam melakukan diagnosis (McPherson & Moller, 2006).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi *Trichoderma* endofitik dari akar

tanaman pisang sehat di daerah DI Yogyakarta, yang akan digunakan sebagai agens pengendali hayati petogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* pada pisang.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu. Penelitian ini dilakukan di Sub Laboratorium Mikologi Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan dan Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Penelitian dilaksanakan sejak bulan Desember 2012 hingga bulan Juli 2013.

Isolasi *Trichoderma* Endofitik. Sampel akar yang digunakan berasal dari beberapa jenis pisang budidaya sehat yang diambil dari daerah Kabupaten Sleman, Bantul dan Kulonprogo di DI Yogyakarta. Akar langsung diproses dalam 24 jam setelah dikoleksi. Akar dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan tanah yang menempel sebelum dilakukan sterilisasi permukaan (Regina *et al.*, 2003). Akar dipotong dengan ukuran 0,5 cm, didisinfeksi dengan NaOCl 0,5 % selama 2 menit, dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali dan dikering-anginkan. Akar dibelah membujur, kemudian diletakkan pada medium TSM (*Trichoderma Selective Medium*) dan diinkubasikan dalam keadaan gelap pada suhu 25°C.

Amplifikasi PCR ITS dari DNA. Identifikasi *Trichoderma* endofitik dengan menggunakan teknik molekuler untuk mendeteksi dan membedakan antara *Trichoderma* endofitik menggunakan PCR dan dilanjutkan dengan sekuensing. Urutan basa dari primer ITS1 (*forward*) adalah 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCGG-3', dan ITS2 (*reverse*) adalah 5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'. Untuk ekstraksi DNA, miselium jamur berumur lima hari pada medium PDA dipindahkan ke dalam erlenmeyer berisi 60 ml medium PDB (*Potato Dextrose Broth*) dan ditumbuhkan selama enam hari pada suhu 25 °C di atas *shaker* dengan kecepatan 120 rpm.

Amplifikasi pada mesin PCR dengan campuran reaksi total volume 20 µl yang terdiri dari *Mega Mix Royal* (MMR) 10 µl, akuabides 7 µl, pasangan primer ITS1 dan ITS2 masing-masing 1 µl, serta template (sampel DNA) 1 µl, dengan konsentrasi 5 ug. Hasil campuran dimasukkan ke dalam tabung 2 µl dan dimasukkan ke dalam mesin PCR. Mesin PCR dijalankan dengan siklus denaturasi awal 95 °C selama 5 menit satu siklus, dilanjutkan dengan 35 siklus (94 °C selama 1 menit untuk denaturasi, 55 °C selama 1 menit untuk *annealing*, 72 °C selama 1 menit 30 detik untuk polimerasi DNA), kemudian ditambahkan satu siklus terakhir pada 72 °C

selama 10 menit dan reaksi akan berakhir pada suhu 20 °C. DNA hasil amplifikasi PCR digunakan untuk melakukan elektroforesis dengan gel agarosa 1,0% dalam 1x larutan buffer TBE. Lima µL hasil amplifikasi PCR dicampur dengan 2 µL *loading dye* dimasukkan ke dalam sumuran gel dan dijalankan pada tegangan 100 volt selama 25 menit. Amplikon dari hasil PCR dikirim ke FirstBASE untuk dilakukan sekuensing. Urutan gen isolat yang telah disekuensing dengan primer ITS1 dan ITS2 disesuaikan dengan urutan gen *Trichoderma* yang tersedia di <http://www.mycobank.org>. untuk mengetahui kesamaan sekuensing dari spesies *Trichoderma* endofitik dengan menggunakan program dari BLAST-N data *Genebank*. Selanjutnya dilakukan *alignment* dengan metode *ClustalW*, dan hasil *alignment* digunakan sebagai data input untuk membuat pohon filogenetik dengan menggunakan metode *Neighbour Joining*, dan untuk penyusunan pohon filogenetik menggunakan perangkat lunak (*software*) *Mega 5* (Tamura *et al.*, 2011).

Karakterisasi Morfologi *Trichoderma* Endofitik.

Identifikasi konvensional berdasarkan karakteristik secara makroskopis dan mikroskopis dengan menumbuhkan isolat-isolat yang ditemukan pada medium PDA (*Potato Dextrose Agar*). Identifikasi genera dan spesies dilakukan secara molekuler berdasarkan metode Narayan *et al.* (2007) dan secara morfologis menggunakan studi diskripsi berdasarkan Rifai (1969) dan Kubicek & Harman (1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi *Trichoderma* endofitik. Hasil isolasi *Trichoderma* endofitik pada akar beberapa jenis pisang budidaya sehat diperoleh enam isolat, yaitu empat isolat dari Kabupaten Sleman dan dua isolat dari Kabupaten Bantul (Tabel 1).

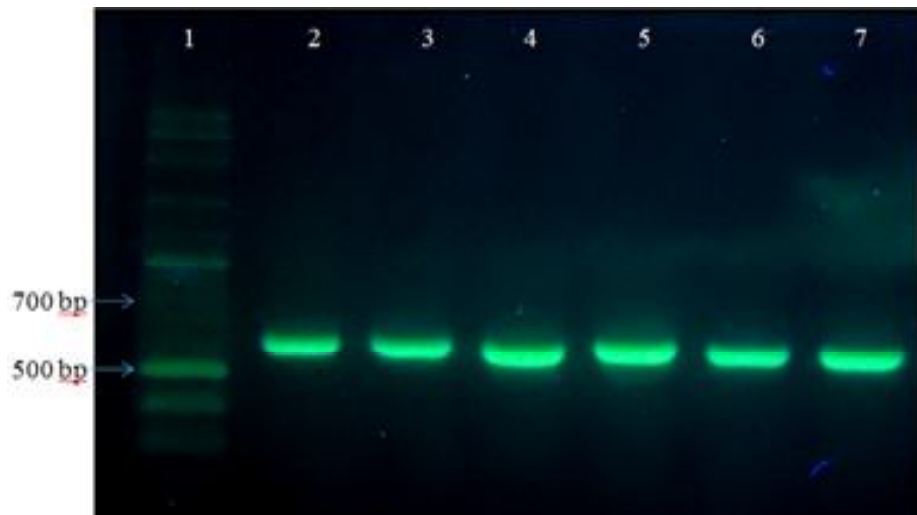
Tabel 1 menunjukkan tiga isolat (Swn-1, Ksn, dan Psr-2) diperoleh dari jenis pisang Ambon dengan lokasi yang berbeda, dan tiga isolat lainnya (Swn-2, Psr-1, dan Psr-3) diperoleh dari tiga jenis pisang, yaitu pisang pulut, pisang raja bandung dan pisang klutuk yang berasal dari dua lokasi yang berbeda juga.

Spesies *Trichoderma* dapat ditemukan dalam berbagai habitat dan merupakan komponen mikroflora tanah, dalam serasah tanaman serta mampu berasosiasi dengan jaringan tanaman (Nacimi *et al.*, 2011). Hal ini membuktikan bahwa *Trichoderma* endofitik juga berasosiasi dengan jaringan akar pisang sehat seperti yang telah didapati sebelumnya oleh Soesanto *et al.* (2011) yaitu *Trichoderma harzianum*, sedangkan *Trichoderma asperellum* dan *Trichoderma koningiopsis* didapat oleh Xia *et al.* (2011). *Trichoderma gamsii* merupakan salah satu *Trichoderma* endofitik yang pertama ditemukan berasosiasi dalam akar pisang.

Beberapa *Trichoderma* endofitik lain yang telah diisolasi pada jaringan berbagai macam tanaman antara lain strain *Trichoderma* DIS70a, DIS 219b, DIS 219f dan DIS172ai pada jaringan *Theobroma cacao* yang digunakan sebagai agens pengendali hayati penyakit kakao (Holmes *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2009), *Trichoderma viridae* serta jamur endofitik lainnya yang diisolasi dari kulit batang *Taxus baccata* (Tayung & Jha, 2010), *Trichoderma atroviride* yang diisolasi dari *Camphotheca acumunata* yang dapat menghasilkan metabolit *Camphocin* untuk menghambat aktivitas kanker (Pu *et al.*, 2013), *Trichoderma brevicompactum* pada *Allium sativum* yang menghasilkan trichodermin yang digunakan untuk mengendalikan patogen *Rhizoctonia solani* dan patogen lain (Shentu *et al.*, 2014), *Trichoderma* spp. yang diisolasi dari akar *Coffea arabica* yang mampu mengendalikan tracheomycosis pada kopi (Mulaw *et al.*, 2013).

Tabel 1. Hasil eksplorasi *Trichoderma* endofitik di DI Yogyakarta

No.	Nama Isolat	Jenis Pisang	Daerah Asal
1.	Swn-1	Ambon	Sewon, Bantul
2.	Swn-2	Pulut	Sewon, Bantul
3.	Ksn	Ambon	Kalasan Sleman
4.	Psr-1	Raja Bandung	Palangsari, Sleman
5.	Psr-2	Ambon	Palangsari, Sleman
6.	Psr-3	Klutuk	Palangsari, Sleman



Gambar 1. Pola pita DNA isolat *Trichoderma* endofitik hasil elektroforesis; 1. marker MMR; 2. isolat Swn-1; 3. isolat Swn-2; 4. isolat Ksn; 5. isolat Psr-1; 6. isolat Psr-2; dan 7. isolat Psr-3

Amplifikasi PCR ITS dari DNA. Analisis PCR dengan menggunakan primer universal yaitu primer ITS1 dan ITS2 menunjukkan bahwa DNA enam isolat *Trichoderma* endofitik memiliki pita DNA dengan berat molekul sekitar 560 bp (Gambar 1). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Abd-Elsalam *et al.* (2003), bahwa penggunaan primer universal ITS1 dan ITS2 dalam analisis PCR untuk analisis jamur, menghasilkan pita DNA berkisar antara 550 – 570 bp.

Hasil analisis sekuens ITS DNA berdasarkan *database* pada program BLAST-N menunjukkan, bahwa isolat Swn-1, isolat Swn-2 dan isolat Psr-1 mempunyai hubungan kekerabatan dengan *Trichoderma harzianum*, isolat Ksn dengan *Trichoderma asperellum*, isolat Psr-2 dengan *Trichoderma gamsii* dan isolat Psr-3 dengan *Trichoderma koningiopsis*, dengan tingkat kemiripan 99 % (Tabel 2).

Pohon filogenetik (Gambar 2) menunjukkan bahwa isolat mengelompok menjadi 3 klaster, yaitu isolat Psr-1, isolat Swn-2 dan isolat Swn-1 mengelompok menjadi satu klaster dan berkerabat dekat dengan *Trichoderma harzianum* dengan nilai *bootstrap* 100, isolat Ksn, salah satu isolat yang diisolasi dari jenis pisang ambon mengelompok menjadi 1 klaster tersendiri, berkerabat dekat dengan *Trichoderma asperellum* dengan nilai *bootstrap* 100, sedangkan isolat Psr-2 dan Psr-3 mengelompok menjadi satu klaster. Isolat Psr-2 berkerabat dekat dengan *Trichoderma gamsii* dengan nilai *bootstrap* 100, dan isolat Psr-3 berkerabat dekat dengan *Trichoderma koningiopsis* dengan nilai

bootstrap 100, Hal ini menunjukkan bahwa sekuen DNA yang disusun berdasarkan gen 5,8S rRNA dapat memisahkan *Trichoderma* endofitik sampai pada spesies (Samuels *et al.*, 2006).

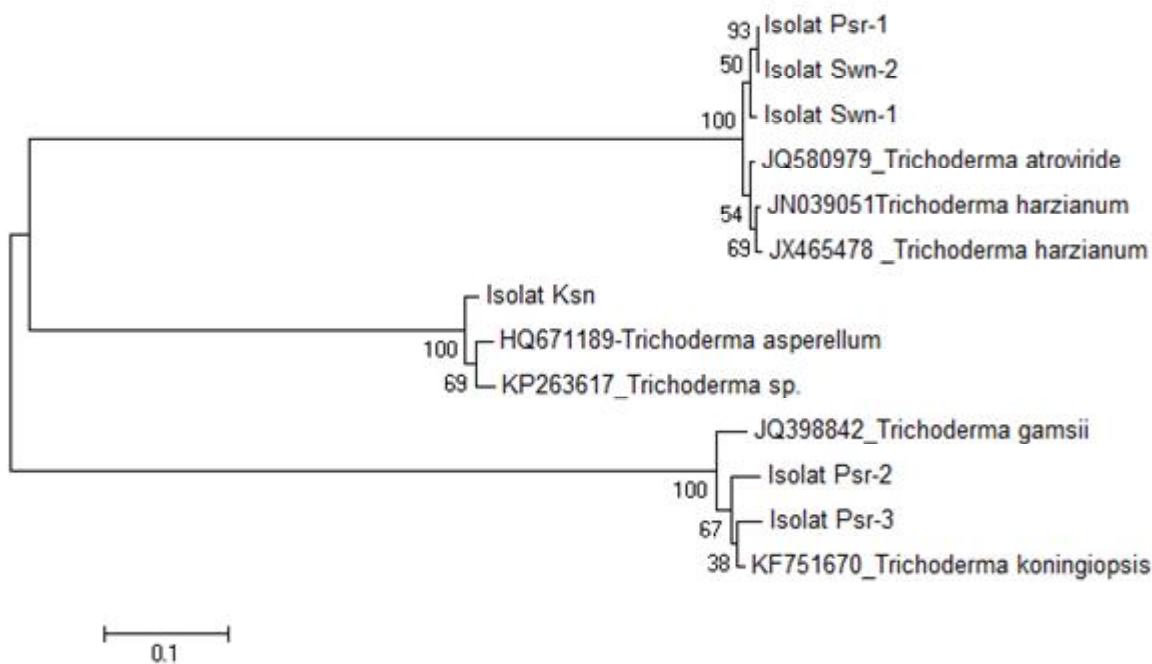
Karakterisasi Morfologi *Trichoderma* Endofitik. Semua isolat ditumbuhkan dalam medium PDA dan diinkubasikan pada suhu 30°C. Hasil pengamatan karakteristik morfologi enam isolat *Trichoderma* endofitik memperlihatkan adanya perbedaan warna koloni, bentuk koloni, bentuk konidiofor dan bentuk konidium dari masing-masing isolat (Gambar 3).

Hasil pengamatan koloni *Trichoderma* isolat Swn-1, Swn-2, Ksn, dan Psr-1 membentuk lingkaran, berwarna hijau gelap pada setiap lingkaran. Koloni isolat Psr-2 dan Psr-3 tumbuh merata pada permukaan media dan konidium terbentuk pada pinggir cawan petri. Hal ini ditandai dengan pinggiran cawan petri yang berwarna hijau gelap (Gambar 3). Ciri-ciri yang sama dikemukakan oleh Soesanto *et al.* (2011) yang menemukan isolat *Trichoderma* 4 dengan bentuk koloni melingkar serta warna koloni hijau gelap pada lingkaran. Rata-rata koloni tumbuh penuh mencapai pinggiran cawan petri dalam waktu 5 hari. Karakteristik morfologi *Trichoderma* spp. tersebut selengkapnya pada Tabel 3.

Pada Tabel 3, ukuran konidium isolat Swn-1 (2,80 x 2,47 µm) lebih besar dari ukuran konidium isolat Swn-2 (2,79 x 2,42 µm), isolat Ksn (2,64 x 1,87 µm), dan isolat Psr-1 (2,58 x 2,46 µm), namun ukuran konidium isolat Psr-2 (2,83 x 2,52 µm) lebih besar dari ukurana konidium isolat Psr-3 (2,87 x 1,93 µm). Berdasarkan

Tabel 2. Perbandingan tingkat kemiripan Isolat *Trichoderma* endofitik sampel akar pisang dan sekuen gen ITS1 dan ITS2 pada *Gene Bank*

Isolat	Nama Spesies	Homologi (%)	<i>Gene Bank Accesion Number</i>
Swn-1	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	JN039051
Swn-2	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	JN039051
Ksn	<i>Trichoderma asperellum</i>	99	HQ671189
Psr-1	<i>Trichoderma harzianum</i>	99	JN039051
Psr-2	<i>Trichoderma gamsii</i>	99	JQ398842
Psr-3	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	99	KF751670

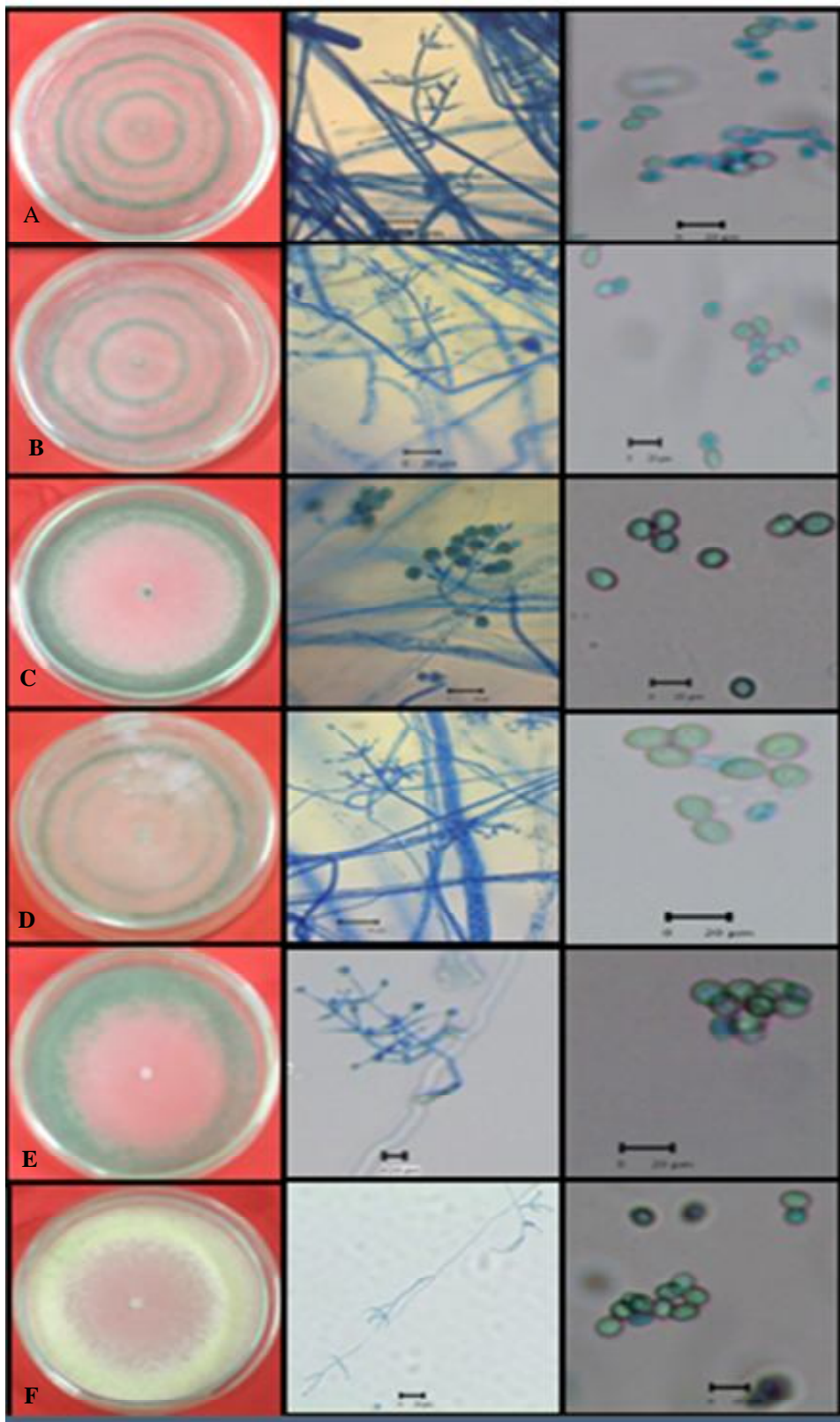


Gambar 2. Pohon filogenetik isolat *Trichoderma* endofitik berdasarkan NCBI

ukuran konidium dan fialid pada isolat Swn-1, isolat Swn-2 dan isolat Psr-1 merupakan kisaran ukuran dari *Trichoderma harzianum* Rifai, yaitu ukuran konidium antara (2,5)2,7-3,5 x 2,1-2,6(-3,0) μm dan ukuran fialid 3,5-7,5 x 2,5-3,8 μm . Warna konidium untuk keenam isolat *Trichoderma* adalah mempunyai warna konidium yang sama yaitu hijau. Bentuk konidium isolat Swn-1, Swn-2, Ksn, Psr-1 dan Psr-2 adalah sama yaitu oval dan bentuk konidium isolat Psr-3 adalah bulat. Dinding konidium isolat Swn-1, Swn-2, Psr-2 dan Psr-3 tidak

berbeda yaitu tipis dan dinding konidium isolat Ksn dan Psr-1 adalah tebal (Kubicek & Harman, 1998).

Ukuran fialid isolat Swn-1 (7,0 x 3,23 μm) dan isolat Swn-2 (6,99 x 3,25 μm) tidak terpaut jauh, juga ukuran fialid isolat Ksn (5,84 x 2,95 μm) dan isolat Psr-1 (5,43 x 3,02 μm), sedangkan ukuran fialid Psr-2 (7,44 x 2,13 μm) sangat berbeda dengan isolat Psr-3 (8,3 x 2,76 μm). Sementara hifa isolat Swn-1, Swn-2, Ksn, Psr-1, Psr-2 dan Psr-3 tidak ada perbedaan yaitu hialin dan bersekat (Rifai, 1969).



Gambar 3. Karakteristik morfologi isolat *Trichoderma* endofitik berumur 5 hari. A. Isolat Sw-1; B. Isolat Sw-2; C. Isolat Ksn; D. Isolat Psr-1; E. Isolat Psr-2; dan F. Isolat Psr-3; Bar = 20 µm

Tabel 3. Karakteristik morfologi enam isolat *Trichoderma* endofitik

Morfologi	Isolat					
	Swn-1	Swn-2	Ksn	Psr-1	Psr-2	Psr-3
Bentuk koloni	Bulat, membentuk lingkaran	Bulat, membentuk lingkaran	Bulat, membentuk lingkaran	Bulat, membentuk lingkaran	Tumbuh merata pada permukaan media	Tumbuh merata pada permukaan media
Warna koloni	Hijau gelap	Hijau gelap	Hijau gelap	Hijau gelap	Hijau gelap	Hijau-kuning kusam
Bentuk konidium	Oval	Oval	Oval	Oval	Bulat	Oval
Ukuran konidia	2,80 x 2,47 μm	2,79 x 2,42 μm	2,64 x 1,87 μm	2,58 x 2,46 μm	2,83 x 2,52 μm	3,21 x 1,93 μm
Warna konidium	Hijau muda	Hijau muda	Hijau	Hijau muda	Hijau	Hijau
Dinding konidium	Tipis	Tipis	Tebal	Tebal	Tipis	Tipis
Ukuran fialid	7,01 x 3,23 μm	6,99 x 3,25 μm	5,84 x 2,95 μm	5,43 x 3,02 μm	7,44 x 2,13 μm	8,3 x 2,76 μm
Hifa	Hialin, bersekat	Hialin, bersekat	Hialin, bersekat	Hialin, bersekat	Hialin, bersekat	Hialin, bersekat

SIMPULAN

Empat spesies *Trichoderma* yaitu, *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. koningiopsis* dan *T. gamsii* ditemukan sebagai *Trichoderma* endofitik yang berada di dalam akar beberapa jenis pisang budidaya sehat di DI Yogyakarta.

SANWACANA

Terima kasih kepada NUFFIC (AGRI 4 project UNPATTI) sebagai penyandang dana beasiswa dan Direktorat Pendidikan Tinggi, Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi sebagai penyandang dana penelitian melalui skim Hibah Doktor tahun 2015.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Elsalam KA, Aly IN, Abdel-Satar MA, Khalil MS, & Verreet JA. 2003. PCR identification of fusarium genus based nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Afr. J. Biotechnol.* 2(4): 82-85.
- Aly AH, Debbab A, Kjer J, & Proksch P. 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity* 41(1): 1-16.
- Bailey BA, Strem MD, & Wood D. 2009. *Trichoderma* species from endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. *Mycol. Res.* 113(12): 1365-1376.
- Druzhinina IS, & Kubicek CP. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 6(2): 100-112.
- Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, & Kubicek CP. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience* 47: 55-64.
- Hanada RE, de Jorge Souza T, Pomella AW, Hebbbar KP, Pereira JO, Ismaiel A, & Samuel GJ. 2008. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. *Mycol. Res.* 112(11): 1335-1343.
- Harman GE, Howell CR, Veterbo A, Chet I, & Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol* 2: 43-56.

- Holmes KA, Schroers HJ, Thomas SE, Evans HC, & Samuels GJ. 2004. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of South America. *Mycol. Prog.* 3(3): 199-210.
- Jeewon R, Itto J, Mahadeb D, Jaufeerallu-Fakim Y, Wang HK, & Liu AR. 2013. DNA based identification and Phylogenetic characterisation of endophytix and saprobic fungi from *Antidesma madagascariense*, a medicinal plant in Mauritius. *J. Mycol.* 2013: 1-10.
- Kubicek CP, & Harman GE. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* Vol.1. Basic biology, taxonomy and Genetic. Taylor & Francis Ltd. 1 Gunpowder Square, London. UK. Taylor & Francis Inc, 1900 Frost Road, Suite 101. Bristol. USA.
- Laran S, Perello A, Simon MR, & Mareno V. 2002. Isolation and analysis of endophytic mecroorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Word J. Microb. Biot.* 18(7): 683-686.
- McPherson MJ, & Moller SG. 2006. PCR. Sec. Ed. Taylor & Francis Group. 270 Madison Avenue, New York. US.; 4 Park Square, Milton Park Abingdon. UK.
- Mulaw TB, Druzhinina IS, Kubicek CP, & Atanasova L. 2013. Novel endophytic *Trichoderma* spp. Isolated from healthy *Coffea arabica* roots are capable of controlling Coffee Tracheomycosis. *Diversity* 5: 750-766.
- Naeimi S, Khodaparats S, Javan-Nikkhah M, Vagvolgyi C, & Kredics L. 2011. Spesies patterns and phylogenetic relationships of *Trichoderma* strain in rice fields of Southern Caspian Sea, Iran. *Cereal Res. Commun.* 39(4): 560-568.
- Paul N, Kim WK, Woo SK, Park MS, & Yu SH. 2007. Fungal endophytes in roots of *Aralia* species and their antifungal activity. *Plant Pathol.* 23(4): 287-294.
- Ospina-Giraldo MD, Royse DJ, Chen X, Romaine CP, 1999. Molecular phylogenetic analyses of biological control of *Trichoderma harzianum* and other biotypis of *Trichoderma* Associated with mushroom green mold. *Phytopathology* 89(4): 308-313.
- Pimentel IC, Glienke-Blanco C, Gabardo J, Stuart RM & Azevedo JL. 2006. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49(6): 705-711.
- Pu X, Qu X, Chen F, & Bao J, Zang G, & Lou Y. 2013. Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 97(21): 9365-9375.
- Geris dos Santos R, Rodrigues-Fo E, Rocha WC, & Teixeira MFS. 2003. Endophytic fungi from *Melia azedarach*. *World J. of Microbiol. Biot.* 19(8): 767-770.
- Rifai MA. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Papers* 116(1):1-56.
- Samuels GJ. 1996. *Trichoderma*: A review of biology and systematic of the genus. *Mycol. Res.* 100(8): 923-935.
- Shentu X, Zhan X, Ma Z, Yu X, & Zhang C. 2014. Antifungal activity of metabolites of endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Braz. J. Microbiol.* 45(1): 248-254.
- Soesanto L, Utami DS, & Rahayuniati RF. 2011. Morphological characteristics of four *Trichoderma* isolates and two endophytic *Fusarium* isolates. *Can. J. on Scientific and Industrial Res.* 2(8): 294-306.
- Sriwati R, Chamsudan TJ, & Sukarman. 2011. Deteksi dan identifikasi cendawan endofotik *Trichoderma* yang berasosiasi pada tanaman Kakao. *Agrista* 15(1): 15-20.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, & Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10): 2731-2739.
- Taylor JW, Spatafora J, O'Donnell K, Lutzoni F, James T, Hibbett DS, Geiser D, Bruns TD, Blackwell M. 2004. The Fungi. In: Cracraft J & Donoghue MJ (Eds.) *Assembling the Tree of Life*. Oxford University Press, New York. Pp: 171-194.

- Tayung K & Jha DK. 2010. Antimicrobial endophytic fungal assemblages inhabiting bark of *Taxus baccata* L. of Indo-Burma mega biodiversity hotspot. *India J. Microbiol.* 50 (Suppl 1): 74-81.
- Widyastuti SM & Hariani M. 2006. Peranan *Trichoderma reesei* E.G. Simmons pada pengendalian *Damping off* semai Cendana (*Santalum album* Linn.) *J. Perlind. Tan. Indon.* 12 (2): 62-73.
- Xia X, Lie TK, Qian X, Zheng Z, Huang Y, & Shen Y. 2011. Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots. *Microb. Ecol.* 61: 619-625.