

MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYZE OF FUSARIUM FROM AGARWOOD AND OTHERS FUSARIUM WITH DIFFERENT TYPE OF NUTRITION BASED ON GEN ITS 1

Oleh :

I Gde Adi Suryawan Wangiyana

Lecturer staff of Forestry Faculty of NTB University

Abstract: Fusarium is a common mold used as inoculants for inducing resin formation in agarwood tree. Molecular phylogenetic analyze is important to be done to determine the correlation between type of nutrition of Fusarium and its ability to associated with Agarwood. ITS 1 gene sequences were downloaded from NCBI gene bank was used as sequences to reconstruct phylogenetic tree. ClustalX 2.1 program were used for multiple alignment of sequences. Two phylogenetic tree, Neighbor Joining and Maximum Likelihood, were reconstructed with MEGA 5.1 program. One phylogenetic tree were reconstructed with mrbayes program using Markov Chain Monte Carlo method. Phytit program were used to construct similarity matrix between sequences. Different type of nutrition on Fusarium including: endophytic, saprophytic and phytopathogenic were not a monophyletic based on phylogenetic tree analyze. That type of nutrition was formed by adaptation process. They do not share that characteristic with their common ancestor. Fusarium from agarwood has the same clade with phytopathogenic Fusarium in all phylogenetic trees. They also have the highest ITS 1 gene sequence similarity with phytopathogenic Fusarium. Therefore, it could be concluded that Fusarium from agarwood are phytopathogenic group and they have pathogen-host association with agarwood.

Keyword: Fusarium, type of nutrition, phylogenetic

PENDAHULUAN

Gaharu merupakan produk hasil hutan bukan kayu yang memiliki nilai ekonomis tinggi karena dapat digunakan untuk berbagai industri, diantaranya: industri parfum, kosmetik, farmasi serta digunakan untuk produksi dupa, sabun, shampoo dan teh gaharu. Gaharu terbentuk dari respon tanaman gaharu terhadap keberadaan kapang yang masuk ke dalam batang gaharu dengan memproduksi resin yang akan menyelubungi miselium kapang tersebut. Resin itulah yang beraroma wangi dan mengandung berbagai metabolit sekunder (Novriyanti et al., 2011).

Eksplotasi secara berlebihan terhadap gaharu menyebabkan banyak spesies gaharu terutama dari genus *Aquilaria* dan *Gyrinops* menjadi langka dan masuk CITES appendix II serta berstatus *Vulnerable* (Schmidt, 2011). Hal ini menyebabkan mulai ditingkatkannya usaha budidaya terhadap gaharu. Salah satu factor penentu keberhasilan budidaya gaharu adalah seleksi terhadap kapang inokulan yang dapat menginduksi produksi resin padagaharu. Salah satu kapang yang dominan digunakan sebagai inokulan untuk induksi gaharu di Indonesia adalah *Fusarium* yang memiliki kondisi pertumbuhan cocok dengan iklim Indonesia (Sri Wilarso et al., 2010). Oleh

karena itu eksplorasi dan studi lebih lanjut mengenai genus kapang ini merupakan hal yang penting untuk dilakukan.

Fusarium dikenal sebagai patogen yang banyak menginfeksi tanaman – tanaman pertanian maupun perkebunan. Dengan demikian *Fusarium* yang di induksikan pada gaharu juga dapat dianggap sebagai jamur patogen yang menginfeksi tanaman gaharu sehingga memicu respon. Meskipun demikian data yang mendukung hipotesis ini masih belum kuat karena selama ini klasifikasi *Fusarium* kebanyakan dilakukan secara konvensional. Klasifikasi secara konvensional dianggap kurang dapat mengakomodasi dinamika variasi antar mikroorganisme yang sangat luas dan tidak dapat direpresentasikan hanya dengan data morfologi (Madigan et al., 2013). Untuk itulah diperlukan bantuan data molekular melalui analisis filogenetik. Hanya saja, Klasifikasi molekular filogenetik masih sangat jarang dilakukan khususnya pada genus *Fusarium*.

Untuk melakukan analisis filogenetik diperlukan marker molekular yang memenuhi kriteria: 1) terdapat secara universal pada tiap organisme, 2) bersifat homologus yang ditandai dengan sekuen *conserve* dan memiliki kesetaraan fungsi pada seluruh organisme, 3) merupakan

molekul *housekeeping* artinya memiliki fungsi yang sangat esensial pada tiap organisme yang memilikinya (Lengeler et al., 1993). *Inter Transcribe Spacer* (ITS) merupakan urutan nukleotida *non-coding* yang terletak antara segmen DNA pengkode gen 18S rRNA, 5.8S rRNA dan 28S rRNA yang dapat digunakan sebagai marker untuk analisis filogenetik (Keller et al., 2008). Beberapa peneliti telah menggunakan ITS untuk mempelajari hubungan kekerabatan secara molekuler antara beberapa spesies pada *Fusarium* patogen, saprofit maupun patogenik (Barik et al., 2011), Sementara itu Permalatha dan Karla (2013) menggunakan ITS sebagai marker molekuler untuk melakukan analisis filogenetik fungi endofit yang diisolasi dari gaharu *Aquilaria mallacensis*. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan analisis molekuler filogenetik terhadap beberapa spesies *Fusarium* saprofitik, endofitik ataupun pathogen serta hubungannya dengan *Fusarium* yang diisolasi dari gaharu sebagai acuan tipe nutrisi dari isolat gaharu tersebut.

METODE

Sekuen ITS 1 pada gen 5.8S rRNA dengan panjang sekitar 500 nukleotida diperoleh dari website NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan menggunakan mode *nucleotide searching* (Tabel 1). Sekuen disimpan dalam dua bentuk file, yang pertama adalah file “gene bank” yang berisi sekuen serta keterangan sekuen tersebut dan yang kedua adalah file “FASTA” yang hanya berisi sekuen yang digunakan untuk analisis filogenetik. Kedua file tersebut disimpan dalam bentuk notepad.

a. Sequence Alignment dengan Program ClustalX 2.1.

Alignment bertujuan untuk menata *sequence* ITS 1 agar satu sama lain diletakkan sesuai dengan posisi homologi antar *sequence* sehingga dapat dibandingkan. *Sequence Alignment* dilakukan dengan menggunakan program ClustalX 2.1 (Larkin et al., 2007). File FASTA digunakan sebagai data input. *Alignment* total (*do complete alignment*) dilakukan agar diperoleh file yang kompatibel untuk program MEGA, PHYDIT dan mrbayes

b. Pembuatan Matriks Similaritas DNA dengan Phytit

Program **Phytit** menggunakan data input berupa hasil *alignment* dengan format “gde” sehingga harus dilakukan konversi terlebih dahulu agar data kompatibel. Matriks similaritas

nukleotida dibuat dengan mode *Generating Similarity Table*. Output berupa Matrix similaritas selanjutnya di copy ke MS Excel untuk pengaturan tampilan yang lebih baik (Chun, 1995)

Tabel 1. Sekuen gen ITS 1 diperoleh dari website NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

No	Tipe nutrisi	Isolate yang digunakan	ITS 1 Gene Bank accession number	Panjang sekuen (bp)
1	Isolat gaharu	<i>Fusarium solani</i> strain AF14	JX173101	618
2	Isolat gaharu	<i>Fusarium solani</i> YNAS09	GU355653	482
3	Isolat gaharu	<i>Fusarium equiseti</i> HNAS11	GU355670	483
4	Isolat gaharu	<i>Fusarium equiseti</i> YNAS07	GU355651	470
5	Endofitik	<i>Fusarium quadricinctum</i> HN3-2B	FJ624268	561
6	Endofitik	<i>Fusarium lateritium</i> GX8-2A	FJ637744	547
7	Endofitik	<i>Fusarium polyphthalidicum</i> E6730d	HM999904	505
8	Endofitik	<i>Fusarium redolens</i> Ppf2	EF495234	562
9	Endofitik	<i>Fusarium culmorum</i> Vega487	EF687909	524
10	Fitopatogenik	<i>Fusarium asiaticum</i> MAFF 306700	AB289550	545
11	Fitopatogenik	<i>Fusarium incarnatum</i>	DQ307676	532
12	Fitopatogenik	<i>Fusarium polyphthalidicum</i> 11-1p	FJ654673	488
13	Fitopatogenik	<i>Fusarium proliferatum</i> NOB110	GU363955	562
14	Fitopatogenik	<i>Fusarium pseudograminearum</i> NRRL28331	AJ491294	481
15	Fitopatogenik	<i>Fusarium moniliforme</i> NRRL31085	EF408522	532
16	Saprofitik	<i>Fusarium brachygibbosum</i> AVK	HM130707	534
17	Saprofitik	<i>Fusarium delphinoides</i> GPK	GU828007	501
18	Saprofitik	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	EU637901	457
19	Saprofitik	<i>Fusarium tricinctum</i> Z8	EF611089	533
20	Outgroup	<i>Neurospora crassa</i> FGS 987	AF388914	561

c. Rekonstruksi Phylogenetic Tree dengan MEGA

Rekonstruksi pohon filogenetik pada MEGA 5.1 (Tamura et al. 2011) menggunakan data *sequence* hasil alignment ClustalX 2.1. Karena terdapat perbedaan format file Clustal X dan Mega, file sekuen harus dikonversi terlebih dahulu agar kompatibel. Rekonstruksi Phylogenetic tree dilakukan dengan menggunakan 2 algoritme filogenetik, yaitu: Neighbor Joining dan Maximum Likelihood.

Neighbor Joining tree (Saitou and Nei, 1987) direkonstruksi dengan menggunakan *Test of Phylogeny* bootstrap 1000 replikasi. Model evolusi yang digunakan adalah Kimura 2-parameter. Laju evolusi (*Rates among sites*) menggunakan *Gamma Distributed*. Perlakuan terhadap data jika ada yang hilang (*missing data treatment*) menggunakan mode *complete deletion*.

Maximum Likelihood tree (Felsenstein, 1981) direkonstruksi dengan menggunakan *Test of Phylogeny* bootstrap 1000 replikasi. Model evolusi yang digunakan adalah Kimura 2-parameter. Laju evolusi (*Rates among sites*) menggunakan *Gamma Distributed*. Perlakuan terhadap data jika ada yang hilang (*missing data treatment*) menggunakan mode *use all sites*. Untuk optimasi pohon filogenetik digunakan *ML Heuristic Method Nearest-Neighbor-Interchange* (NNI) dengan *Initial tree for ML* adalah *Neighbor Joining*.

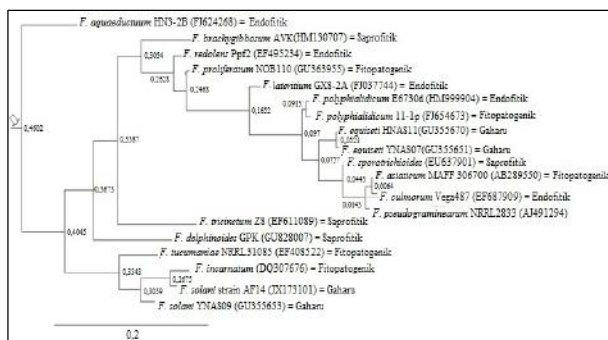
d. Rekonstruksi Phylogenetic Tree dengan Mrbayes 3.2

File yang dimasukkan kedalam program mrbayes 3.2 harus dikonversi dalam format “.nxs” sehingga kompatibel. Sebelum menjalankan program dilakukan setting terlebih dahulu terhadap Likelihood setting, Parsimony Setting dan Markov

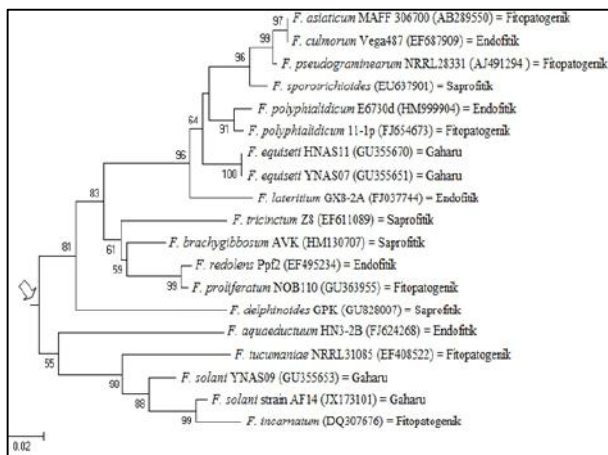
Chain Monte Carlo (MCMC) setting. Untuk MCMC setting Ngen yang digunakan sebanyak 1.000.000 dengan Nruns sebanyak 2, Nchains sebanyak 4 serta samplefreq dan printfreq masing – masing sebanyak 1000. Setelah running MCMC selesai, dilakukan sumpburnin = 25% dari total sampel. P-file yang merupakan distribusi probabilitas dijadikan sebagai acuan untuk memilih 1 diantara 1001 pohon yang direkonstruksi yaitu dengan criteria nilai LnL terbesar. Selanjutnya pohon berdasarkan criteria tersebut ditampilkan dengan menggunakan program FigTree v1.3.1.

HASIL

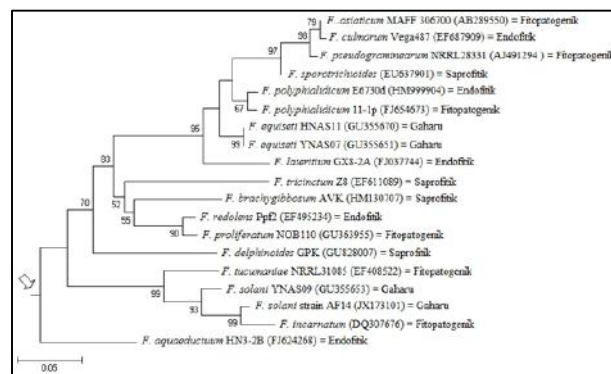
Validitas dari tiap *phylogenetic tree* terjamin karena nilai bootstrap yang dihasilkan semuanya diatas 50%. *Phylogenetic tree* yang direkonstruksi dengan algoritme berbeda menunjukkan skala divergensi yang juga berbeda. Meskipun demikian, tiap *phylogenetic tree* menunjukkan kelompok clade yang kurang lebih sama.



Gambar 1. Phylogenetic Tree ke - 335 chain 1 ITS 1 genus *Fusarium* menggunakan metode Markov Chain Monte Carlo program mrbayes 3.2.



Gambar 2. Neighbor Joining Tree ITS 1 genus *Fusarium* dengan model evolusi Kimura 2 parameter 1000 bootstrap yang direkonstruksi dengan MEGA 5.1



Gambar 3. Maximum Likelihood tree ITS 1 genus *Fusarium* dengan model evolusi Kimura 2 parameter 1000 bootstrap yang direkonstruksidengan MEGA 5.1

Tabel 2. Matriks Similaritas Nukleotida gen ITS 1 dengan program PHYDIT

Testis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	—	32.478	23.480	28.459	63.457	80.455	86.458	94.461	66.453	84.472	81.452	85.458	84.459	82.470	77.474	78.477	56.471	65.446	44.439	59.453	
2	93.471	—	26.578	83.468	73.474	77.468	87.469	84.467	50.465	85.475	83.467	87.470	80.464	86.483	85.471	77.473	77.474	41.467	73.480	11.506	
3	90.481	91.479	—	16.512	65.478	84.465	85.474	78.477	83.470	81.452	79.463	81.454	75.468	84.480	82.470	80.470	80.470	80.470	80.470	11.506	
4	88.490	90.466	96.499	—	69.453	86.455	89.450	84.477	88.478	82.483	85.485	88.480	86.480	72.461	85.484	78.473	60.472	88.471	78.473	11.512	
5	85.487	84.466	86.474	84.477	—	10.470	25.488	23.478	25.477	22.472	18.470	26.480	24.478	78.473	78.473	78.473	78.473	78.473	78.473	11.506	
6	88.481	84.466	86.474	84.477	100	—	5.481	2.524	12.455	28.454	45.454	12.485	85.479	78.473	58.444	53.453	52.453	78.473	78.473	11.506	
7	85.487	84.466	86.474	84.477	84.466	84.466	—	7.481	9.451	25.441	17.478	26.436	35.433	72.454	41.480	41.478	41.478	78.473	78.473	11.506	
8	85.487	84.466	86.474	84.477	84.466	84.466	94.466	—	12.455	28.454	45.454	27.476	46.461	78.473	58.444	53.453	52.453	78.473	78.473	11.506	
9	84.471	81.132	82.08	80.75	94.91	94.481	97.36	93.01	—	19.453	33.433	20.438	36.442	80.472	51.455	50.454	40.454	78.473	78.473	11.506	
10	86.481	83.4	84.43	82.89	96.471	96.4	94.44	94.44	95.43	—	25.452	24.79	36.460	76.481	53.439	50.439	49.439	78.473	78.473	11.506	
11	85.487	84.466	86.474	84.477	94.481	94.481	92.38	92.38	92.38	92.38	—	21.484	82.478	80.471	77.444	74.453	61.451	78.473	78.473	11.506	
12	85.487	84.466	86.474	84.477	86.486	86.486	93.44	93.44	93.44	93.44	93.44	—	82.489	84.481	82.489	84.471	81.471	81.471	81.471	11.506	
13	80.482	83.472	80.46	84.438	87.481	87.481	80.482	80.482	82.483	80.482	82.483	80.482	—	14.489	62.482	64.482	64.482	64.482	64.482	11.506	
14	87.472	83.456	84.471	82.79	87.481	87.481	83.483	84.481	84.481	82.483	82.483	84.481	84.481	—	64.478	63.471	64.478	64.478	64.478	11.506	
15	87.472	83.456	84.471	82.79	87.481	87.481	83.483	84.481	84.481	82.483	82.483	84.481	84.481	84.481	—	10.484	40.478	50.478	106.478	11.506	
16	87.472	83.456	84.471	82.79	87.481	87.481	83.483	84.481	84.481	82.483	82.483	84.481	84.481	84.481	84.481	—	10.484	40.478	50.478	106.478	11.506
17	88.481	83.472	80.46	84.438	90.4	90.4	80.482	80.482	80.482	80.482	80.482	80.482	80.482	80.482	80.482	80.482	—	46.463	52.478	106.478	11.506
18	85.487	84.466	86.474	84.477	88.481	88.481	84.486	84.486	84.486	84.486	84.486	84.486	84.486	84.486	84.486	84.486	84.486	—	85.480	115.478	11.506
19	85.487	84.466	86.474	84.477	84.466	84.466	82.4	82.4	82.4	82.4	82.4	82.4	82.4	82.4	82.4	82.4	82.4	82.4	—	108.468	11.506
20	80.482	79.466	78.463	78.463	78.463	78.463	78.463	78.463	78.463	78.463	78.463	78.463	78.463	78.463	78.463	78.463	78.463	78.463	78.463	—	11.506

Keterangan:
Angka dibawah diagonal matriks menunjukkan persentase similitas sementara angka diatas diagonal matriks menunjukkan besaran similitas yang sama per jumlah similitas total yang dibandingkan

- 1: *F. solani* YNAS07 6: *F. equiseti* YNAS07 11: *F. polyphthalidicum* F67300 16: *F. redolens* Pp2
2: *F. incarnatum* NRRL31085 7: *F. asiaticum* MAFF 306700 12: *F. lateritium* G3X-2A 17: *F. proliferatum* NOB110
3: *F. solani* strain AF14 8: *F. pseudogrammosum* NRRL28331 13: *F. polyphthalidicum* 11-1p 18: *F. brachyglabrous* AVK
4: *F. incarnatum* 9: *F. culmorum* Vega487 14: *F. delphinoides* GPK 19: *F. aquaeductum* HN3-2B
5: *F. equiseti* HNAS11 10: *F. sporocarpium* 15: *F. trichinum* Z8 20: *N. crassa* FGS 987

- (a) Isolat *F. solani* YNAS07 memiliki similitas tertinggi dengan *F. incarnatum* dan
(b) *F. solani* strain AF14 memiliki similitas tertinggi dengan *F. incarnatum*
(c) Isolat *F. equiseti* HNAS11 memiliki similitas tertinggi dengan *F. polyphthalidicum* 11-1p
(d) Isolat *F. equiseti* YNAS07 memiliki similitas tertinggi dengan *F. polyphthalidicum* 11-1p

Hasil *alignment* menunjukkan bahwa terdapat tingkat homologi yang tinggi antara setiap sekuen yang dibandingkan karena persentase nukleotida yang homolog rata – rata diatas 80% (kecuali dibandingkan dengan outgrup *N. crassa*).

PEMBAHASAN

Internal Transcribe Spacer (ITS) merupakan segmen nukleotida *non – coding* yang terletak diantara gen 18S rRNA, 5,8S rRNA dan 28S rRNA (Keller et al., 2008). ITS banyak digunakan dalam identifikasi molecular beberapa spesies fungi, diantaranya: Identifikasi *Candida* dengan menggunakan metode RFLP (Pinto et al., 2004) serta deteksi beberapa fungi yang diisolasi dari tanah menggunakan RT-PCR (Anderson et al., 2007). Pada kelompok Ascomycota, ITS 1 dan ITS 2 menunjukkan hubungan Co-evolusi dan keduanya saling berinteraksi untuk maturasi rRNA precursor sehingga dapat dikatakan bahwa keduanya memiliki peran yang esensial dan dapat

dijadikan marker molekular (Hauser and Wang, 2005).

Beberapa peneliti telah menggunakan ITS untuk mempelajari hubungan kekerabatan secara molekular antara beberapa spesies pada *Fusarium* endofit, saprofit maupun patogenik (Barik et al., 2011). ITS juga banyak digunakan sebagai marker molekular untuk klasifikasi filogenetik dan identifikasi molekular fungi terkait dengan tanaman gaharu, diantaranya: Permalatha dan Karla (2013) yang menggunakan ITS sebagai marker molekular untuk melakukan analisis filogenetik fungi endofitik yang diisolasi dari gaharu *Aquilaria mallacensis* serta Tian et al. (2013) yang menggunakan gen ITS untuk identifikasi molekular fungi Endofitik pada gaharu *Aquilaria sinensis*.

Neighbor Joining adalah algoritme filogenetik yang menggunakan *distance matrix* sementara itu Maximum Likelihood adalah algoritme filogenetik yang menggunakan metode *character state berbasis optimality search criterion* (Saitou and Nei, 1987; Felsenstein, 1981). Meskipun demikian, *phylogenetic tree* yang direkonstruksi dengan kedua algoritme tersebut memperlihatkan susunan *clade* yang kurang lebih sama. Hal yang sama juga berlaku untuk *phylogenetic tree* yang direkonstruksi dengan metode Markov Chain Monte Carlo program *mrBayes*. Hal ini menunjukkan bahwa sekuen ITS 1 yang digunakan merupakan marker molekular yang stabil meskipun dianalisis dengan algoritme berbeda – beda.

Berdasarkan *phylogenetic Tree* yang direkonstruksi dengan berbagai program berbeda, dapat dikatakan bahwa sifat endofitik, saprofitik dan fitopatogenik pada beberapa spesies *Fusarium* tidak bersifat monofiletik. Hal initerlihat dari bercampurnya *Fusarium* endofitik, saprofitik dan fitopatogenik pada *clade* yang sama untuk tiap *phylogenetic Tree* baik yang direkonstruksi dengan menggunakan program MEGA maupun *mrBayes*. Ketiga sifat tersebut merupakan proses adaptasi yang dilakukan oleh spesies *Fusarium* sehingga bukan merupakan sifat yang sejak awal diturunkan oleh nenek moyangnya. Oleh karena itu, ketiga sifat tersebut bersifat variabel sehingga *Fusarium* endofitik bias saja menjadi pathogen atau *Fusarium* saprofitik bias sajamenjadi endofitik atau fitopatogenik.

Empat sekuen ITS 1 diperoleh dari empat isolat *Fusarium* yang diisolasi dari tanaman penghasil gaharu menunjukkan pola untuk membentuk *sister* taksa dengan sesama anggota *Fusarium* dari gaharu. *Fusarium equiseti* HNAS11 dan *Fusarium equiseti* YNAS07 selalu tergabung dalam *sister* taksa yang sama pada semua *Phylogenetic tree* dengan nilai bootstrap 100% dari 1000 bootstrap yang digunakan. Hal ini

menunjukkan bahwa isolat gaharu secara evolusioner memiliki kemampuan berasosiasi dengan gaharu yang diwariskan dari nenek moyang terdekatnya tanpa ada *sharing* dengan nenek moyang isolat gaharu lainnya. Analog dalam silsilah keluarga, *sister* taksa adalah saudara kandung dari orang tua yang sama (Gregory, 2008). Meskipun demikian terdapat penyimpangan yaitu *Fusarium solani* strain AF14 yang merupakan isolat dari gaharu tidak bergabung dalam *sister* taksa *Fusarium solani* YNAS09 sesama isolat gaharu. Isolat ini justru memiliki *sister* taksa *Fusarium incarnatum* yang merupakan *Fusarium* fitopatogenik.

Hipotesis bahwa kemampuan *Fusarium* yang diisolasi dari tanaman penghasil gaharu merupakan kemampuan patogen yang diwariskan dari nenek moyang didukung oleh ketiga *phylogenetic tree*. *Fusarium solani* AF14 dan *Fusarium solani* YNAS09 yang merupakan isolat Gaharu yang secara konsisten tergabung bersama *Fusarium incarnatum* dengan tipe nutrisi fitopatogenik dalam *clade* yang memiliki nenek moyang terdekat yang sama. *Fusarium equiseti* HNAS11 dan *Fusarium equiseti* YNAS07 juga tergabung dalam *clade* nenek moyang terdekat yang sama dengan *Fusarium polyphialidicum* 11-1p yang memiliki tipe nutrisi fitopatogenik. Hal ini juga didukung oleh matriks similaritas yang menunjukkan bahwa *Fusarium solani* AF14 dan *Fusarium solani* YNAS09 memiliki tingkat similaritas nukleotida tertinggi dengan *Fusarium incarnatum*. Sementara itu *Fusarium equiseti* HNAS11 dan *Fusarium equiseti* YNAS07 memiliki tingkat similaritas tertinggi dengan *Fusarium polyphialidicum* 11-1p.

PENUTUP

a. Simpulan

Meskipun tipe nutrisi berbeda tidak bersifat monofiletik namun *Fusarium* isolat gaharu seara filogenetik memiliki hubungan dengan *Fusarium* yang bersifat fitopatogenik sehingga bentuk asosiasinya dengan gaharu merupakan hubungan antara patogen dengan inang

b. Saran

Perlu dilakukan analisis tambahan berupa analisis DNA Fingerprinting untuk menambah data berupa hubungan similaritas dari tiap sekuen yang ada untuk menghasilkan klasifikasi yang bersifat polifasik.

DAFTAR PUSTAKA

Alexander Keller, Tina Schleicher, Jörg Schultz, Tobias Müller, Thomas Dandekar,

- Matthias Wolf. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. *Gene* 430 (2009) 50–57
- Anderson, I. C. and P. I. Parkin. 2007. Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. *Journal of Microbiological Methods*. Volume 68, Issue 2, February 2007, Pages 248–253
- Barik B. P, K. Tayung and P. N. Jagadev. 2011., Molecular phylogeny and RNA secondary structure of *Fusarium* species with different lifestyles. *Plant Pathology & Quarantine* 1(2), 205–219
- Chun, J. 1995. *Computer-assisted classification and identification of actinomycetes*. Ph. D. Thesis. University of Newcastle, United Kingdom.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17, 368–376.
- Gregory, R. T. 2008. Understanding Evolutionary Tree. *Evo Edu Outreach* (2008) 1:121–137
- Hausner G and X. Wang. 2005. Unusual compact rDNA gene arrangements within some members of the Ascomycota: evidence for molecular co-evolution between ITS1 and ITS2. *Genome*. 2005 Aug;48(4):648–660
- Larkin M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, D. G. Higgins, 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23(21): 2947–2948.
- Lengeler, J. W., G. Drews, H. G. Schlegel. 1999. *Biology of Prokaryotes*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Madigan, M., J. Martinko, D. Stahl & D. Clark. 2012. *Brock Biology of Microorganisms* 13th ed. Pearson. Boston.
- Novriyanti, E. E. Santoso, B. Wiyono, and M. Turjaman., 2011. Chemical study of eaglewood (gaharu) resulting from inoculation of *Fusarium* sp. on *Aquilaria microcarpa*. In: Proceeding of Gaharu Workshop Development of Gaharu Production Technology. Ed: M. Turjaman.
- Pinto P. M, M. A. Resende, C. Y. Koga-Ito, J. A. Ferreira, M. Tendler. 2013. rDNA-RFLP identification of *Candida* species in immunocompromised and seriously diseased patients. *Canadian Journal of Microbiol.* 2004 Jul;50(7):514–20.
- Premalatha, K, A. Kalra. 2013. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from resinous and healthy wood of *Aquilaria malaccensis*, a red listed and highly exploited medicinal tree. *fungus ecology*. 6. (2013) 205 – 211
- Saitou. N and M. Nei, 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4):406–425. 1987
- Schmidt, M. S., 2011. Introduction To CITES And Agarwood Overview. PC20 Inf. 7 Annex 9.
- Sri Wilarso, B. R., E. Santosodan A. Wahyudi, 2010. Identifikasi Jenis-jenis Fungi yang Potensial terhadap Pembentukan Gaharu dari Batang *Aquilaria* spp. *Jurnal Silviculture Tropika*. Vol. 01 No. 01 Desember 2010, Hal. 1 – 5.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 28, 2731–9.
- Tian, J, X. Gao, W. M. Zhang, L. Wang and L. H. Qu. 2013. Molecular identification of endophytic fungi from *Aquilaria sinensis* and artificial agarwood induced by pinholes-infusion technique. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 12(21), pp. 3115–3131, 22 May 2013