

## 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 W.**

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. Phytidit 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 molecular antara beberapa spesies pada *Fusarium* patogen, saprofit maupun patogenik (Barik et al., 2011), Sementara itu Permalatha dan Karla (2013) menggunakan ITS sebagai marker molecular untuk melakukan analisis filogenetik fungi endofit yang diisolasi dari gaharu *Aquilaria mallacensis*. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan analisis molecular 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 Phytid

Program **Phydit** 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 maguaductum</i> HN3-2B	FJ624268	561
6	Endofitik	<i>Fusarium lateritium</i> GX8-2A	FJ037744	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 cucurbitariae</i> NRRL31085	EF408522	532
16	Saprofitik	<i>Fusarium brachyibbosum</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*.

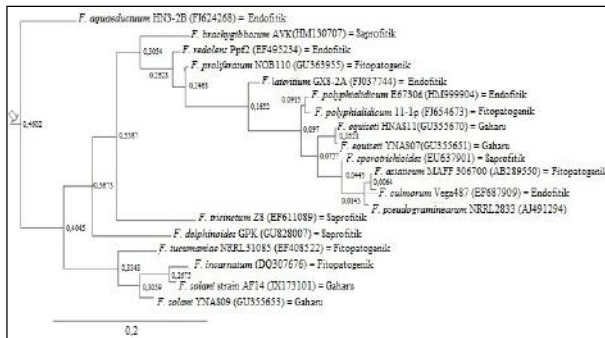
### d. Rekonstruksi Phylogenetic Tree dengan Mrbayes 3.2

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

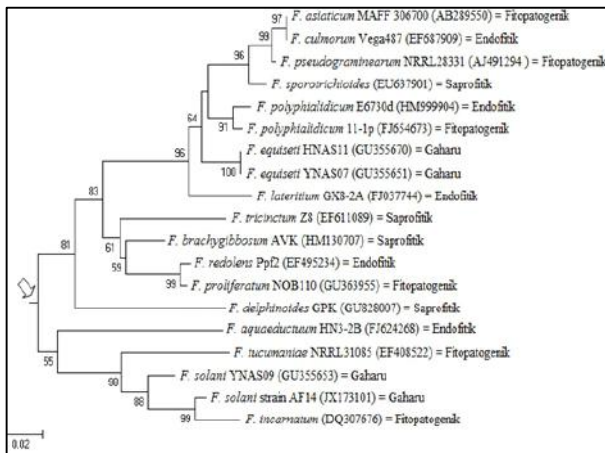
Chain Monte Carlo (MCMC) setting. Untuk MCMC setting Ngen yang digunakan sebanyak 1.000.000 dengan Nruns sebanyak 2, Nchains sebanyak 4 serta samplefreq dan printfreq masing – masing sebanyak 1000. Setelah running MCMC selesai, dilakukan sumpburnin = 25% dari total sampel. P-file yang merupakan distribusi 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**

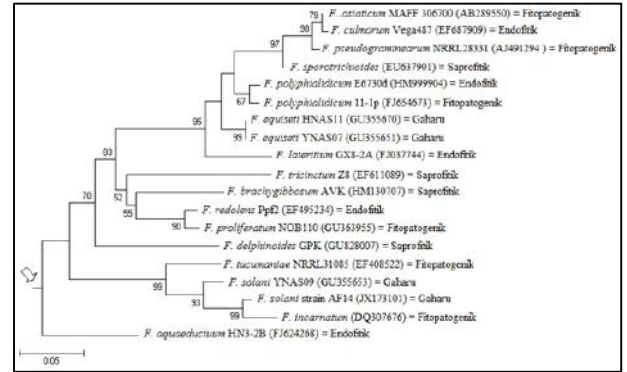
Validitas dari tiap *phylogenetic tree* terjamin karena nilai bootstrap yang dihasilkan semuanya diatas 50%. *Phylogenetic tree* yang direkonstruksi dengan algoritme berbeda menunjukkan skala divergensi yang juga berbeda. Meskipun demikian, tiap *phylogenetic tree* menunjukkan kelompok clade yang kurang 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 Nukelutida gen ITS 1 dengan program PHYDIT

Tes1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	—	32.48	23.480	28.429	63.457	80.355	86.458	94.811	65.453	84.312	81.452	85.458	55.452	70.470	72.474	84.477	56.471	65.444	64.439	83.453
2	93.31	—	85.578	58.408	74.216	77.048	87.509	91.467	54.816	85.853	89.390	91.007	64.466	85.511	77.537	77.339	81.407	73.480	111.506	71.506
3	93.81	91.29	—	165.312	65.478	84.463	85.547	87.539	81.852	79.365	93.540	71.468	64.469	82.539	89.539	92.538	93.511	111.528	71.528	71.528
4	85.930	90.146	89.906	—	69.453	89.455	89.507	84.477	88.504	87.452	83.445	88.500	72.461	72.461	85.484	78.571	80.573	88.517	83.511	111.502
5	85.87	84.66	86.4	84.77	—	94.70	25.488	23.428	25.472	22.452	18.470	16.480	7.787	15.470	18.488	18.488	16.478	23.487	70.453	89.463
6	88.8	84.62	86.2	84.109	100	—	25.467	23.421	25.463	22.441	18.462	16.471	7.767	15.463	18.469	18.469	16.467	23.477	70.453	89.463
7	85.59	82.43	84.26	82.45	84.709	84.63	—	5.481	2.524	12.455	25.504	45.541	25.485	65.470	78.515	58.544	53.531	52.511	76.497	110.513
8	85.8	82.43	83.44	82.39	84.64	84.54	98.96	—	7.481	9.451	25.461	17.478	26.538	19.413	72.454	51.480	41.476	41.480	76.477	109.472
9	84.4	82.74	84.04	82.24	84.69	94.8	99.62	98.54	—	12.455	28.504	47.520	22.479	65.461	78.491	66.532	51.522	52.511	47.484	108.512
10	84.7	81.32	82.08	80.75	84.91	84.81	97.36	98.91	97.36	—	19.453	39.430	30.642	80.457	51.455	50.447	40.447	40.447	74.452	108.459
11	86.8	83.8	84.43	82.89	96.17	96.8	94.44	94.38	94.44	95.83	—	25.502	47.499	60.460	76.496	61.534	59.508	49.447	71.473	108.469
12	83.8	82.45	82.5	82.27	94.38	94.44	91.68	92.28	92.68	92.72	95.02	—	21.484	62.478	80.514	77.544	54.533	61.518	78.498	110.519
13	89.96	83.41	88.92	83.32	96.866	96.866	93.42	93.28	93.34	96.39	96.96	96.96	—	82.489	84.488	82.488	82.488	82.488	82.488	110.471
14	83.8	83.72	80.26	84.28	81.81	81.88	80.43	83.89	82.8	82.86	86.96	81.81	80.26	—	83.492	82.488	75.485	68.446	68.446	108.468
15	87.27	83.56	84.41	82.79	87.97	83.7	84.83	84.14	84.13	82.49	84.68	84.44	86.89	89.25	—	64.576	63.511	64.499	82.488	111.492
16	87.66	85.64	84.07	84.84	89.81	89.75	89.14	89.89	89.78	89.91	91.87	93.2	90.78	87.47	87.84	—	10.548	40.595	50.6	106.512
17	83.18	83.22	85.66	84.64	90.4	90.13	90.06	89.35	90.23	89.99	92.25	93.63	90.78	87.17	87.81	98.18	—	46.336	63.523	108.513
18	85.68	84.02	82.38	82.98	88.6	83.4	89.04	91.46	89.68	91.23	90.1	88.23	86.39	87.19	92.42	91.32	91.32	—	65.508	115.518
19	85.58	85.77	84.02	84.18	84.2	83.99	83.9	84.07	84.12	83.53	85.05	84.34	84.26	85.87	81.46	87.23	87.96	87.2	—	108.498
20	83.13	78.06	78.65	76.83	78.62	79.8	78.52	77.33	78.78	75.56	76.02	78.43	77.28	76.67	76.71	79.54	79.18	77.45	78.41	—

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 F6730d      16: F. radolentia Pp2f  
 2: F. incarnatum NRRL31085      7: F. asiaticum MAFF 306700      12: F. lateritium GX3-2A      17: F. proliferatum NOB110  
 3: F. solani strain AF14      8: F. pseudograminearum NRRL28331      13: F. polyphthalidicum 11-1p      18: F. brachyglabrous AVK  
 4: F. aqueductum HN3-2B      9: F. culmorum Vega487      14: F. delphinoides GPK      19: F. aqueductum HN3-2B  
 5: F. equiseti HNAS11      10: F. sporobolusoides      15: F. trisetum Z8      20: N. crassa FGS 987

(a) Isolat F. solani YNAS09 memiliki similitas tertinggi dengan F. incarnatum da  
 (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

**PEMBAHASAN**

Internal Transcribe Spacer (ITS) merupakan segmen nukleutida 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 saja menjadi 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):648-60
- 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* 13<sup>th</sup> 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