

IDENTIFIKASI MOLEKULER JAMUR ANTAGONIS *Trichoderma harzianum* DIISOLASI DARI TANAH PERTANIAN DI MALANG, JAWA TIMUR

Molecular Identification of Antagonistic Fungi *Trichoderma harzianum* Isolated
from Agricultural Land In Malang, East Java

Yohana Avelia Sandy, Syamsuddin Djauhari, Antok Wahyu Sektiono
Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya
Jalan Veteran, Malang 65145

ABSTRACT

T. harzianum is one of the antagonistic fungi species were discovered and have important benefits to agriculture in Indonesia. The purpose of this study is to identify and to confirm the *T. harzianum* isolates collected in several laboratory and obtained from several farms in Malang, East Java. The isolates were analyzed based on the *internal transcribed spacer sequences* (ITS) in the region of ribosomal DNA using PCR techniques. In this study, morphological and molecular identification by PCR using universal primers ITS 1 and ITS 4 obtained different results. In this study, morphological and molecular identification by PCR using primers ITS 1 and ITS 4 obtained different results. In morphological identification, the third isolates obtained from organic farmland and horticulture in Batu, cocoa plantation crops in Blitar and agriculture land in Ngijo, the result shown as *T. harzianum*. But after do the genetic similarity search in GeneBank DNA with PCR result, was found that the three isolates is *T. asperellum* with the percentage of samples T1 F is 98%, T1 R is 98%, T2 F is 95%, T2 R is 97%, and F is 98% T3, T1 R is 99% with a PCR product of 600 bp.

Keywords : *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, Molecular, PCR

ABSTRAK

T. harzianum merupakan salah satu spesies jamur antagonis yang banyak ditemukan dan memiliki manfaat yang penting bagi pertanian di Indonesia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi dan mengkonfirmasi isolat *T. harzianum* yang dikoleksi di beberapa laboratorium dan didapatkan dari beberapa lahan pertanian di Malang, Jawa Timur. Isolat tersebut dianalisis berdasarkan pada sekuen *internal transcribed spacer* (ITS) di daerah DNA ribosom dengan menggunakan teknik PCR. Dalam penelitian ini identifikasi secara morfologi dan molekuler dengan teknik PCR menggunakan primer universal ITS 1 dan ITS 4 didapatkan hasil yang berbeda. Secara morfologi ketiga isolat yang didapatkan dari Tanah Pertanian Organik Batu, BPTP Ngijo dan Tanah Pertanaman Kakao Blitar merupakan jamur antagonis *T. harzianum* namun setelah dilakukan penelusuran kesamaan genetik DNA hasil PCR pada *GeneBank* ditemukan bahwa ketiga isolat merupakan *T. asperellum* dengan presentase sampel T1 F adalah 98 %, T1 R adalah 98% , T2 F adalah 95% , T2 R adalah 97% , dan T3 F adalah 98%, T1 R adalah 99% dengan produk PCR 600 bp.

Kata Kunci: *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, Molekuler, PCR

PENDAHULUAN

Potensi jamur *Trichoderma spp.* sebagai jamur antagonis yang bersifat preventif terhadap serangan penyakit tanaman telah menjadikan jamur tersebut semakin luas digunakan oleh petani dalam usaha pengendalian organisme pengganggu tumbuhan (OPT). Oleh sebab itu, perlu dilakukan koleksi, inventarisasi, dan preservasi mikroba sebagai sumber agen pengendali hayati, baik untuk keperluan konservasi sumberdaya genetik mikroba maupun sebagai bahan kajian untuk mengembangkannya.

Sebelum dilakukan koleksi pada suatu mikroba perlu dilakukan identifikasi terlebih dahulu. Identifikasi jamur dapat dilakukan secara morfologi maupun molekuler. Identifikasi morfologi dilakukan dengan memisahkan koloni yang berbeda pada media baru, seperti berbeda pada warna koloni, tekstur dan rata-rata waktu tumbuh koloni (Frohlich *et al.*, 2000). Akan tetapi susunan dari taksonomi morfospesies tidak dapat menggambarkan filogeni hingga tingkat spesies dan oleh karena itu diperlukan pendekatan identifikasi alternatif. Salah satu alternatif identifikasi dapat dipelajari dalam biologi molekuler yang merupakan cabang ilmu pengetahuan yang mempelajari hubungan antara struktur dan fungsi molekul-molekul hayati serta kontribusi hubungan tersebut terhadap pelaksanaan dan pengendalian berbagai proses biokimia.

Dengan penemuan mengenai struktur DNA, dikembangkanlah teknik identifikasi secara molekuler yang dilakukan untuk mengatasi masalah taksonomi jamur (Takamatsu, 1998) dan beberapa penelitian juga menggunakan teknik ini untuk identifikasi jamur (Guo *et al.*, 2000). Perbandingan sekuen pada gen penyandi ribosomal DNA dapat digunakan sebagai karakter untuk identifikasi molekuler suatu organisme karena gen ini memiliki sekuen yang terkonservasi maupun variabel (Kurtzman dan Fell, 2006).

Identifikasi berdasarkan karakter morfologi tidak dapat digunakan untuk membedakan jamur hingga tingkat spesies (Price *et al.*, 1978) sedangkan karakter molekuler dapat digunakan untuk mengidentifikasi khamir hingga tingkat spesies (Van der Vossen *et al.*, 2003). Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dilakukan identifikasi molekuler untuk memastikan spesies jamur *T. harzianum* yang dikoleksi di beberapa laboratorium dari beberapa lahan pertanian di Malang, Jawa Timur.

METODE PELAKSANAAN

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di *Biochemistry Laboratory* (JOSEI Laboratory) Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Japan dan dilanjutkan di Laboratorium Mikologi, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya mulai bulan November 2014 hingga Januari 2015.

Pembuatan Media Kentang Dextrosa Agar (PDA)

PDA dibuat dengan cara, 250 gram kentang direbus dalam 1 liter aquades sampai lunak. Kemudian disaring dan air hasil saringan diukur hingga 1 liter kemudian ditambah 20 gram agar dan 20 gram dextrose, lalu direbus kembali sampai mendidih dan disaring kemudian disimpan di botol scoff.

Platting Media PDA

Platting dilakukan didalam LAFC karena kondisi harus steril. Cawan Petri yang telah disterilkan didekatkan pada Bunsen, lalu media PDA pada botol kaca dimasukkan ke cawan Petri sedikit demi sedikit. Setelah itu, cawan Petri diwrapping hingga rapat agar tidak terkontaminasi..

Perbanyakan Isolat jamur

Isolat jamur *T. harzianum* masing-masing ditumbuhkan pada media PDA. Tiga isolat jamur antagonis *T. harzianum* yang merupakan koleksi dengan sumber yang berbeda, yaitu berasal dari eksplorasi tanah pertanian organik Batu dan tanah perkebunan

tanaman kakao di Blitar yang dikoleksi di laboratorium mikologi Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya dan dari tanah pertanian Ngijo yang dikoleksi oleh BPTP Ngijo.

Identifikasi Morfologi

Identifikasi tiga isolat jamur *T. harzianum* dilakukan dengan pengamatan jamur secara makroskopis meliputi pengamatan terhadap warna, bentuk koloni dan umur *full plate*. Kemudian pengamatan secara mikroskopis yang meliputi pengamatan terhadap hifa atau miselium, dilihat dari warna dan bentuk spora, bentuk hifa dan ada tidaknya sekat pada hifa (Hamdiyati, 2010).

Identifikasi Molekuler

Perbanyakkan Isolat Pada Media Cair

Media yang digunakan dalam perbanyakkan ini adalah media PDB (Potato Dextrose Broth). ketiga isolat jamur *T. harzianum* masing-masing ditumbuhkan pada media PDB di LAFC. Setelah itu media yang telah berisi isolat jamur *T. harzianum* diinkubasi selama 125 menit pada suhu 25°C.

Isolasi DNA Genom

Isolat yang telah ditumbuhkan di dalam media PDB disaring menggunakan vacuum. Kemudian ketiga isolat jamur *T. harzianum* diletakkan pada tube, dan diberi label masing-masing T1 (Sampel Ngijo), T2 (Sampel Batu) dan T3 (Sampel Blitar). Masing-masing isolat ditumbuk halus dengan menggunakan nitrogen cair pada mortar dan ditambahkan 1 ml *lysis buffer* serta 1 µl Mercaptoethanol. Lalu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf baru lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Kemudian ditambahkan 500 µl *Potassium Acetate* 5 Molar dan di homogenkan dengan cara dibolak-balik sebanyak 10-20 kali dan diinkubasi pada es selama 5 menit. Setelah itu isolat disentrifugasi pada suhu 4°C selama 10 menit dengan 10.000 g.

Sebanyak 500 µl fasa atas diambil dengan ujung tips yang steril, lalu dipindahkan ke tabung eppendorf yang baru. Lalu ditambahkan

500 µl campuran Phenol, CHCl₃, dan Isoamyl alcohol. Dan disentrifugasi suhu 4°C selama 3 menit dengan 13.000 g. Kemudian fasa atas (supernatan) diambil 400 µl dan dipindahkan ke tabung eppendorf baru. Lalu ditambahkan 400 µl campuran Phenol, CHCl₃, dan Isoamyl alcohol. Dan disentrifugasi pada suhu 4°C selama 3 menit dengan 13.000 g. Fasa atas diambil 300 µl dan dipindahkan ke tabung eppendorf baru. Lalu ditambahkan 300 µl campuran CHCl₃ dan Isoamyl alcohol kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C selama 3 menit dengan 13.000 g. Setelah disentrifugasi upper layer (fasa atas) dipindahkan ke tabung eppendorf baru sebanyak 250 µl.

Setelah semua rangkaian diatas maka dilakukan Purifikasi DNA. Langkah awal yang dilakukan adalah menambahkan 1/10 kali 3M Sodium acetate yang berarti 25 µl 3M Sodium acetate. Dan ditambahkan pula 500 µl EtOH 100 %. Kemudian dihomogenkan dengan cara dibolak balik 10-20 kali dan diinkubasi pada suhu -80°C selama 30 menit. Setelah itu disentrifugasi pada suhu 4°C selama 10 menit dengan 13.000 g. Setelah itu EtOH diambil dan dibuang, dan ditambahkan 500 µl EtOH 80 % dan disentrifugasi pada suhu 4°C selama 5 menit dengan 13.000 g. Ethanol kemudian dibuang menggunakan pipet. Tabung eppendorf dibalik dan disimpan diatas tissue untuk mengeringkan pellet selama 30 menit dan sebanyak 20 µl *Nuclease free water* ditambahkan dan dihomogenkan dengan pellet DNA dengan menggunakan pipet.

Setelah itu dilakukan pengukuran konsentrasi DNA yang diperoleh dengan menggunakan alat BioSpec-Nano.

Elektroforesis

Hasil isolasi genom DNA jamur dianalisis dengan elektroforesis gel agarose 0,9 %. Gel dan cetakan direndam pada *buffer* TAE IX pada kolom elektroforesis. Larutan sampel dari *freeze* diambil sebanyak 5 µl, kemudian dicampurkan dengan 1 µl *loading dye* dan 4 µl dH₂O. Sampel dimasukkan ke dalam sumur

yang terdapat dalam gel pada kolom elektroforesis. Setelah sampel dimasukkan, kemudian dielektroforesis pada tegangan 50 volt selama 100 menit. Gel berisi DNA hasil elektroforesis direndam menggunakan larutan *Ethium Bromide* (EtBr) selama 10 menit, kemudian dibilas dengan *delution water* steril. Gel hasil elektroforesis dilihat dengan alat sinar UV (*UV Transluminator*) dan dicetak fotonya.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Proses PCR digunakan untuk amplifikasi DNA Fungi. Ekstraksi genom DNA fungi di amplifikasi menggunakan *primer universal*. Primer tersebut yaitu ITS1 dan ITS4. Primer ITS1 (5'-TCT GTA GGT GAA CCT GCG G-3') dan ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al.*, 1990).

Proses PCR dengan menggunakan alat TaKaRa PCR Thermal Cycler. Setting dilakukan dengan proses denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, kemudian annealing pada suhu 59°C selama 30 detik, kemudian extention pada suhu 72°C selama 1 menit dan final extention pada suhu 72°C selama 7 menit. Dan di ulang selama 30 kali ulangan.

Elektroforesis

Setelah proses PCR (*Polymerase Chain Reaction*) selanjutnya dilakukan elektroforesis lagi untuk mengetahui panjang pita DNA target yang kita inginkan, untuk jamur *T. harzianum* panjang pita DNA target yaitu berkisar 600 bp (Chakraborty, *et al.*, 2010).

Purifikasi DNA

Ketiga sample hasil PCR dipurifikasi menggunakan Phenol, Cloroform dan Isoamyl alcohol dengan perbandingan 25:24:1. sample dipindahkan dari tabung PCR ke tabung appendorf baru menggunakan pipet. Ditambahkan 45 µl phenol : choloform : Isoamyl alcohol dan di vortex kemudian disentrifugasi pada suhu 4°C selama 5 menit dengan 14.000 atm. Sebanyak 40 µl fasa atas (upper layer) dipindahkan pada tabung appendorf baru. Ditambahkan 4 µl CH₃COOK dan 100 µl Ethanol 100%. Kemudian sampel di vortex dan disentrifugasi pada suhu 4°C

selama 10 menit dengan 14.000 atm. Setelah itu upper layer dibuang dan didapatkan pallate. Dan ditambahkan 150 µl Ethanol 70%. Dihomogenkan keatas kebawah selama 10-20 kali dan disentrifugasi pada suhu 4°C selama 5 menit dengan 14.000 atm. Semua uppler layer dibuang dan pallate dikeringkan di atas tissue selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan 30 µl dH₂O dan dihomogenkan. Penyimpanan pallate DNA harus pada suhu -20°C.

Elektroforesis

Setelah proses Purifikasi DNA selanjutnya dilakukan elektroforesis lagi untuk mengetahui ada tidaknya DNA target yang kita inginkan. Untuk jamur *T. harzianum* panjang pita DNA target yaitu berkisar 600 bp (Chakraborty, *et al.*, 2010).

Persiapan Sequencing

Pengukuran Konsentrasi DNA dan Sequence cycle

Pengukuran Konsentrasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat Gene spec. Pelipatgandaan DNA atau biasa dikenal dengan proses *sequence cycle* menggunakan alat TaKaRa PCR Thermal Cycler. Setting dilakukan dengan proses denaturasi pada suhu 96°C selama 10 detik, kemudian annealing pada suhu 50°C selama 5 detik, kemudian extention pada suhu 60°C selama 4 menit dan diulang 25 kali.

Presipitasi ethanol (Ethanol Presipitation)

Presipitasi ethanol dapat pula disebut purifikasi sequence produk. Sampel DNA di flash dan dipindahkan ke tabung appendorf baru. Ditambahkan 64 µl Ethanol 99,5 % (suhu ruangan), kemudian di vortex dan ditambahkan 16 µl dH₂O lalu divortex lagi. Sampel dibungkus alumunium selama 10 menit. Sampel disentrifugasi pada suhu 28°C selama 15 menit dengan 14.000 atm. Semua upper layer dibuang dan ditambahkan 100 µl Ethanol 70 % (suhu ruangan). Sampel disentrifugasi lagi pada suhu 28°C selama 10 menit dengan 14.000 atm. Semua upper layer

dibuang dan dikeringkan dengan dibungkus alumunium foil selama 15 menit (room temperature). Kemudian sampel disimpan pada suhu -20°C sebelum dikirimkan ke perusahaan untuk dilaksanakan sequencing atau pembacaan untai DNA.

Sequencing

Proses pembacaan untai nukleotida DNA dilaksanakan dengan pangiriman sampel ke Gene Experiment Facilities, Yamaguchi University, Ube.

Analisis Data Bioinformatika

Isolat jamur yang telah di subkultur, diidentifikasi sampai tingkat taksa Genus menggunakan metode bioinformatika Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) secara online di alamat website <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

HASIL dan PEMBAHASAN

Morfologi Koloni

Pada pengamatan makroskopik, sampel T1 (Ngijo), T2 (Batu) dan T3 (Blitar) memiliki ciri yang hampir sama. Pada awal pertumbuhan miselium berbentuk seperti kapas berwarna putih dan kemudian menjadi hijau lalu menjadi hijau kegelapan. Pada hari ke tujuh pertumbuhan miselium sudah memenuhi cawan. Pertumbuhan miselium terus berkembang hingga membentuk menyerupai cincin setelah miselium *full plate*. Menurut Shah, *et.al.*(2012) pada media PDA, *T. harzianum* membentuk 1-2 cincin konsentris dengan produksi konidia hijau. Produksi konidia adalah padat di tengah kemudian menuju margin. Konidia hijau dan berbentuk oval. Koloni pada media PDA berwarna hijau tua dan berbentuk bulat. Diameter koloni mencapai lebih dari 9 cm dalam waktu 5 hari. Karakter dari isolat tersebut menunjukkan karakteristik *Trichoderma harzianum*.

Pada pengamatan mikroskopik diketahui bahwa pada sampel T1 (Ngijo), T2 (Batu) dan T3 (Blitar) memiliki konidiofor hialin/bening,

tegak lurus, banyak percabangan, fialid tunggal, konidia berwarna kehijauan, berbentuk oval, tumbuh pada ujung, mudah dikenali dengan pertumbuhan yang cepat dan bagian yang hijau adalah bantalan dari konidia dan konidia berbentuk globuse (bulat). *Trichoderma spp.* memiliki konidiofor bercabang – cabang teratur, tidak membentuk berkas, konidium jorong, bersel satu, dalam kelompok-kelompok kecil terminal, kelompok konidium berwarna hijau biru (Semangun, 1996). *Trichoderma spp.* juga berbentuk oval, dan memiliki sterigma atau phialid tunggal dan berkelompok (Barnet, 1960 dalam Nurhaedah,2002).

T. harzianum memiliki ciri menonjol antara lain koloninya berwarna hijau muda sampai hijau tua yang memproduksi konidia aseksual berbentuk globus dan pertumbuhannya cepat (Anonim, 2010). Dari hasil pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis, ketiga sampel menunjukkan kesamaan morfologi dengan jamur *T.harzianum*.

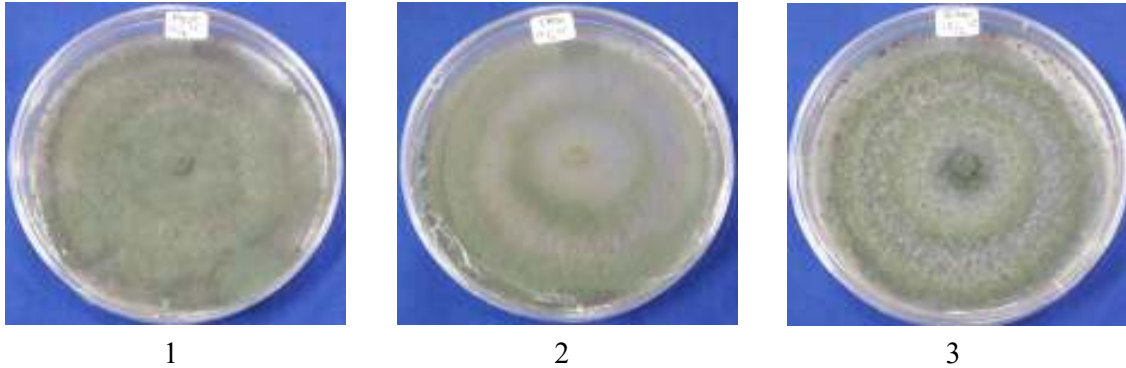
Amplifikasi dan Perunutan DNA

Pita DNA berukuran 600 bp berhasil teramplifikasi dari 3 isolat jamur *T. harzianum*. Urutan pita DNA tersebut sesuai dengan yang diharapkan. Hasil perunutan DNA dari ketiga isolat dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut karena hasil perunutan yang baik.

Hasil perunutan DNA ditemukan hal yang berbeda. Dari Tabel 1. diketahui bahwa urutan basa dari ketiga sampel T1, T2 dan T3 memiliki kemiripan tertinggi dengan *Trichoderma asperellum* sebagai spesies terdekat. Pada sampel T1 presentase keakuratan identifikasi forward dan reverse adalah 98%. Pada sampel T2 presentase keakuratan identifikasi forward adalah 95% dan reverse adalah 97%. Dan pada sampel T3 presentase keakuratan identifikasi forward adalah 98% dan reverse adalah 99%.

Hasil dari analisis diatas dapat dikatakan baik karena presentase kemiripan sangat tinggi dan ditunjukkan pula dari nilai bit score yang tinggi (diatas 700) dan e-valuenya adalah 0. Bit score merupakan ukuran yang sangat penting untuk penjajaran. Semakin tinggi bit score maka tingkat homologi kedua sekuen juga semakin tinggi. Sedangkan nilai e-value merupakan nilai dugaan yang

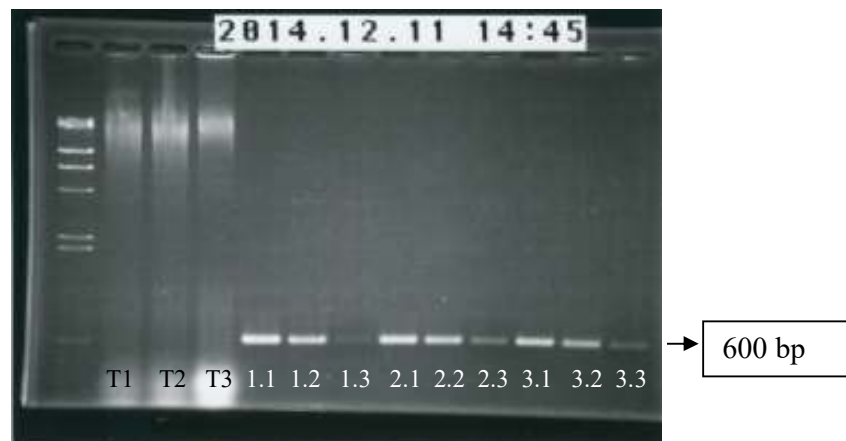
memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuen. Nilai e-value yang semakin tinggi menunjukkan tingkat homologi antara kedua sekuen semakin rendah, dan jika nilai e-value semakin rendah maka tingkat homologi kedua sekuen semakin tinggi. Apabila nilai e-value 0 (nol) hal ini menunjukkan bahwa kedua sekuen tersebut identik (Claverie dan Notredame 2003).



Gambar 1. Makroskopis 1) Sampel T1 (Ngijo), 2) Sampel T2 (Batu), 3) Sampel T3 (Blitar)



Gambar 2. Mikroskopis 1) Sampel T1 (Ngijo), 2) Sampel T2 (Batu), 3) Sampel T3 (Blitar)



Gambar 3. Pita DNA hasil identifikasi berdasarkan DNA menggunakan mesin PCR

Keterangan : T1)Sampel 1, T2) Sampel 2, T3) Sampel 3, 1.1) Sampel1 Hasil PCR 100 ng/μl, 1.2) Sampel1 Hasil PCR 10 ng/μl, 1.3) Sampel1 Hasil PCR 1 ng/μl, 2.1) Sampel2 Hasil PCR 100 ng/μl, 2.2) Sampel2 Hasil PCR 10 ng/μl, 2.3) Sampel2 Hasil PCR 1 ng/ml, 3.1) Sampel3 Hasil PCR 100 ng/μl, 3.2) Sampel3 Hasil PCR 10 ng/μl, 3.3) Sampel3 Hasil PCR 1 ng/μl.

Tabel 1. Hasil BLAST Urutan Fragmen Tiga Isolat

Sampel	Accession No.	Description	Max score	Total Score	Query coverage	E value	Max ident
T1F	KM216989.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	845	1215	83%	0.0	98%
T1R	JF501660.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	963	1267	87%	0.0	98%
T2F	JF501661.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	878	1346	80%	0.0	95%
T2R	JQ294074.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	817	817	55%	0.0	97%
T3F	JF501661.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	773	1145	82%	0.0	98%
T3R	JF501661.1	<i>Trichoderma asperellum</i>	821	918	89%	0.0	99%

sampel T1 F adalah 98 %, T1 R adalah 98% , T2 F adalah 95% , T2 R adalah 97% ,dan T3 F adalah 98%, T3 R adalah 99% dengan produk PCR 600 bp.

KESIMPULAN

Dalam penelitian ini identifikasi secara morfologi dan molekuler dengan teknik PCR menggunakan primer ITS 1 dan ITS 4 didapatkan hasil yang berbeda. Secara morfologi ketiga isolat yang didapatkan dari Tanah Pertanian Organik Batu, BPTP Ngijo dan Tanah Pertanaman Kakao Blitar merupakan jamur antagonis *T. harzianum* namun setelah dilakukan penelusuran kesamaan genetik DNA hasil PCR pada *GeneBank* ditemukan bahwa ketiga isolat merupakan *T. asperellum* dengan presentase

DAFTAR PUSTAKA

- Brown, T.A. 1992. *Genetics: A molecular approach* 2nd ed. Chapman & Hall, London. P:19.
- Chakraborty, B.N., Chakraborty, U., Saha, A., Dey, P.L., Sunar,K. 2010. Molecular Characterization if *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* Isolated from Soils of North Bengal Based on rDNA Markers and Analysis of Their PCR-RAPD Profiles. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* 5 (1):55-61

- Claverie JM, Notredame C. 2003. *Bioinformatics for Dummies*. Indianapolis: Wiley Publishing.
- Kurtzman, C.P. & P.A. Blanz. 1998. Ribosomal RNA/DNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationship. *Dalam* : Kurtzman, C.P & J.W. Fell. (eds.). 1998. *The yeast : A taxonomic study*. 4rd ed. Elsevier, Amsterdam : 69-74.
- Rifai, M.A. 1964. A Revision of Genus *Trichoderma*. University of Sheffield, England, page 56.
- Samuels, G. J., E. Lieckfeldt & H. I. Nirenberg .1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. – *Sydowia*. 51(1): 71-88.
- Wolfe, S.L. 1993. *Molecular and cellular biology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont: xviii + 1145 hlm.
- Samuels, G. J., E.2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. 2002. The Mycological Society of America, Lawrence, KS 66044-8897. *Mycologia*, 94(1), 2002, pp. 146–170.
- Yamada, Y., K.Makimura, H. Mirhendi, K. Ueda, H. Yamaguchi, Y. Nishiyama & M. Osumi. 2002. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeast. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55: 122-125