

KERAGAMAN GENETIK AGENS BIOKONTROL *Trichoderma* DENGAN *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA* (RAPD)

Agus Susanto dan Condro Utomo

ABSTRAK

Pengendalian hayati adalah salah satu pengendalian yang berpeluang baik untuk mengendalikan penyakit busuk pangkal batang (BPB) yang disebabkan *Ganoderma boninense*. Agens biokontrol yang potensial adalah genus dari *Trichoderma* dan *Gliocladium*. Kemampuan masing-masing isolat dari kedua jenis agens biokontrol ini sangat bervariasi. Oleh karena itu pemilihan agens biokontrol menjadi sangat penting dalam keberhasilan pengendalian hayati BPB ini. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui keragaman genetik dari agens biokontrol yang telah diperoleh dengan marka *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Hasil penelitian menunjukkan bahwa jamur agens biokontrol terhadap *G. boninense* yang berupa *T. harzianum*, *T. viride*, dan *G. viride* mempunyai indeks keragaman yang rendah tetapi berdasarkan marka RAPD dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok besar dengan variasi genetik yang besar.

Kata Kunci: Keragaman genetik, RAPD, agens biokontrol, *Ganoderma boninense*

ABSTRACT

Biological control is one of control agents that has a good prospect for controlling basal stem rot disease that caused by *Ganoderma boninense*. Genus *Trichoderma* and *Gliocladium* have a potential as biocontrol agents. The capability of each isolate from both of the biocontrol agents was very variable. The selection of biocontrol agent will be important for the success of biological control agents for controlling of basal stem rot disease. The aim of this research was to study the genetic diversity of biocontrol agents by using *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) marker. Result showed that biocontrol agent fungus i. e. *T. harzianum*, *T. viride*, *G. viride* had low index diversity otherwise they could be clustered into three group based on RAPD marker with high genetic variation.

Key words: genetic diversity, RAPD, biocontrol agent, *Ganoderma boninense*

PENDAHULUAN

Salah satu penyakit yang paling merugikan pada tanaman kelapa sawit adalah penyakit busuk batang (BPB) yang disebabkan oleh *Ganoderma boninense* Pat. (21, 23). Beberapa teknik pengendalian telah disarankan untuk mengendalikan penyakit BPB, misalnya kultur teknis, mekanis, dan perlakuan

kimiawi, namun semuanya tidak memuaskan karena faktanya patogen dapat bertahan hidup di dalam tanah sampai tahunan. Penggunaan agen biokontrol merupakan pendekatan alternatif untuk pengendalian penyakit BPB karena agens biokontrol mempunyai kapasitas tumbuh dan reproduksi di lapangan yang mengikuti hancurnya patogen di dalam tanah.

Trichoderma spp. merupakan jamur saprofitik yang banyak digunakan sebagai agens biokontrol terhadap banyak jamur patogen tanaman (3, 15). Aktivitas mikoparasitik dari *Trichoderma* mungkin melalui antibiosis (5), kompetisi (3), produksi enzim pende-gradasi dinding sel (3, 19) atau kombinasi dari beberapa aktivitas atagonistik di atas. Mekanisme antijamur dari *Trichoderma* yang berperan dalam degradasi dinding sel misalnya kitinase dan glukukanase (9, 10). Pada studi tingkat laboratorium, *Trichoderma* spp. mampu menghambat pertumbuhan miselia *Ganoderma* (1, 4, 16, 20) dan *T. harzianum* menunjukkan daya penghambatan yang lebih tinggi daripada spesies lain dari *Trichoderma*.

Berlainan dengan pentingnya *Trichoderma* dan *Gliocladium* dalam pengendalian hayati jamur patogen tanaman, informasi individual dari kedua spesies ini masih sangat sedikit dan klasifikasi tingkat strain masih sangat sulit (17, 24). Selanjutnya, pada akhir-akhir ini metode molekuler telah diaplikasikan untuk memecahkan masalah taksonomi dari *Trichoderma* dan *Gliocladium*. Teknik *Polymerase Chain Reactin* (PCR) telah sangat luas diaplikasikan untuk karakterisasi *Trichoderma* tingkat strain maupun spesies atau kegunaan yang lain. Schlick (18) menggunakan *PCR fingerprinting* untuk mengidentifikasi strain *Trichoderma* dan menentukan kultur murni, Muthumeenakshi (13) meneliti strain *T. harzianum* yang antagonistik pada jamur edibel komersial dengan menggunakan teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) dan Kuhls (8)

menggunakan sekuen ITS rDNA untuk mempelajari taksonomi dari *Trichoderma*.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji hubungan diantara 26 isolat *Trichoderma* dan *Gliocladium* agar memudahkan identifikasi dan keaslian strain *Trichoderma* terjaga sebab *T. harzianum* telah diformulasi sebagai bahan aktif pada biofungisida produksi Pusat Penelitian Kelapa Sawit (PPKS).

BAHAN DAN METODE

Isolat Jamur

Dua puluh enam isolat *Trichoderma* dan *Gliocladium* diseleksi berdasarkan kapasitas penghambatannya terhadap miselium *Ganoderma* dan produksi enzim kitinase. Isolat ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) selama 4 hari; sejumlah potongan kecil koloni (diameter 0,5 cm) dipindahkan ke medium *Potato Dextrose* (PD). Inkubasi dilakukan pada penggoyang pada suhu kamar dan setelah 4 hari miselium dipanen.

Ekstraksi DNA

DNA diekstraksi dengan menggunakan metode Orozco & Castillo (14), 500 mg miselium ditambahkan dengan PVPP yang telah disimpan dalam nitrogen cair kemudian digerus hingga menjadi tepung, kemudian disuspensikan dalam 1 ml buffer ekstraksi (2% CTAB, 100mM Tris-HCL pH 8.0, 1,4 M NaCl 20 mM EDTA, 1% 2-merkaptotanol) dan dipanaskan sampai 65°C. Campuran diinkubasikan selama 30 menit dengan

sekali-sekali dikocok, kemudian ditambahkan 1 ml chloroform : isoamylalcohol (24: 1) dan sentrifugasi pada 11.000 rpm selama 5 menit, kemudian dituang dan dikeringkan sebagai pellet. Pellet dicuci dengan 70% alkohol dan diencerkan pada 0,5 ml buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). RNA dihilangkan dengan penambahan 10 µg/ml RNase untuk masing-masing *eppendorf* dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu ditambahkan etanol absolut 1 ml, diaduk perlahan, diinkubasi pada suhu 4°C minimal 0.5 jam, dan disentrifus pada 11000 rpm selama 5 menit. Supernatannya dibuang, pelet dicuci dengan etanol 70% dingin sebanyak 500 µl. Setelah itu pelet dikeringkan, dilarutkan dengan 300 µl TE, disimpan pada suhu -20°C. Kualitas DNA agens biokontrol diuji dengan melakukan pemotongan dengan enzim restriksi *EcoRI*.

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Pada awal penelitian ini dilakukan penapisan 20 primer untuk 3 isolat *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, dan *Gliocladium viride*. Primer yang mampu menghasilkan pita DNA polimorfis paling banyak akan digunakan dalam eksperimen lanjutan.

Untuk amplifikasi PCR, campuran reaksi yang terdiri dari 2,5 µl bufer 10 x, 2,5 µl 2 mM dNTPs, 2,5 µl 1,25 mM MgCl₂, 1 µl 10 pmol primer, 0,2 µl 5 unit/W Taq polymerase (Promega) dan akuades 14,3 µl. Selanjutnya campuran master itu dipipet, dimasukkan ke

tabung *eppendorf* yang steril serta ditambahkan 2 µl (50 ng) DNA sampel kemudian dihomogenkan. Mesin PCR diprogram sebagai berikut: setelah 2 menit pemanasan pada 94°C, amplifikasi DNA dilakukan pada 45 siklus yang terdiri dari 1 menit denaturasi pada 94 °C, 1 menit penempelan pada 36 °C dan 2 menit pemanjangan pada 72°C. Setelah 45 siklus diakhiri dengan 4 menit inkubasi pada 72 °C dan pendinginan pada 4 °C. Untuk visualisasi produk PCR, masing-masing sampel dielektroforesis pada gel 1,4% agarose. Dua puluh lima mikroliter hasil amplifikasi dan 5 u l buffer loading dielektroforesis pada 50 volt selama 1 jam 30 menit. Kemudian gel direndam dalam 0,5 µg/ml ethidium bromide selama 30 menit, lalu direndam dalam akuades selama 10 menit. Kemudian hasil elektroforesis divisualisasi di bawah sinar UV dan difoto dengan film instan Polaroid 667.

Analisis Data

Penentuan skor marka DNA hasil RAPD dilakukan menurut kriteria pembentukan marka dari ke-26 agens biokontrol. Bila marka terbentuk diberi skor 1 sedangkan marka yang tidak terbentuk diberi skor 0. Profil pita DNA diterjemahkan ke dalam data biner dengan ketentuan nilai nol (0) untuk tidak ada pita dan satu (1) untuk adanya pita DNA pada satu posisi yang sama dari isolat-isolat yang dibandingkan. Pengelompokan data matrik dan pembuatan dendogram dilakukan menggunakan metode UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Arithmetic*) melalui program NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate System*) versi 2.12.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi DNA dilakukan untuk memperoleh DNA dengan kualitas dan kuantitas yang memenuhi syarat untuk pelaksanaan RAPD. Uji kuantitas dan kualitas tersebut dilakukan dengan proses elektroforesis. Terbentuknya pita DNA yang tebal menunjukkan kuantitas dan kualitas DNA yang cukup bagus (Gambar 1a). Uji kualitas hasil ekstraksi DNA yang kedua adalah dengan pemotongan DNA dengan *EcoRI*. Bila DNA terpotong-potong sehingga terbentuk penampakan *smear* DNA (Gambar 1b), menunjukkan bahwa DNA hasil ekstraksi mempunyai kualitas yang bagus, bebas dari kontaminan yang menghalangi reaksi enzim restriksi. Metode pemurnian yang tepat sangat dibutuhkan terutama untuk mendapatkan kualitas DNA yang tinggi dengan cara yang mudah dan cepat, serta penggunaan biaya yang relatif tidak mahal. Keberhasilan dalam ekstraksi DNA diukur dari jumlah DNA yang dihasilkan,

kondisinya (berat molekul dan warna), serta kemampuannya berligase.

Tidak semua primer yang dicoba pada penapisan primer menghasilkan pita DNA polimorfik yang banyak, bahkan ada yang tidak menghasilkan pita sama sekali yaitu OPD 06, OPD 09, dan OPD 16. Primer yang dipilih untuk uji kekerabatan agens biokontrol adalah yang mempunyai pita DNA polimorfik yang banyak yaitu OPN 16 (AAG CGA CCTG), OPE 14 (TGC GGC TGAG), dan OPD 03 (GTC GCC GTCA). Ketiga primer itu masing-masing menghasilkan pita DNA polimorfik sebanyak 14, 13, dan 11 (Tabel 1).

Ketiga primer terpilih yaitu OPN 16, OPE 14, dan OPD 03 digunakan untuk mengamplifikasi ke-26 agens biokontrol. Pita DNA polimorfik yang ada selanjutnya dinilai skornya dan dimasukkan dalam program NTSYS. Hasilnya berupa dendrogram marka RAPD hubungan kekerabatan agens biokontrol (Gambar 2).



Keterangan: 1 – 26 = nomor isolat agens biokontrol
a = DNA total
b = DNA dipotong dengan *EcoRI*

Gambar 1. Uji kuantitas dan kualitas hasil ekstraksi DNA dari 26 Jamur biokontrol

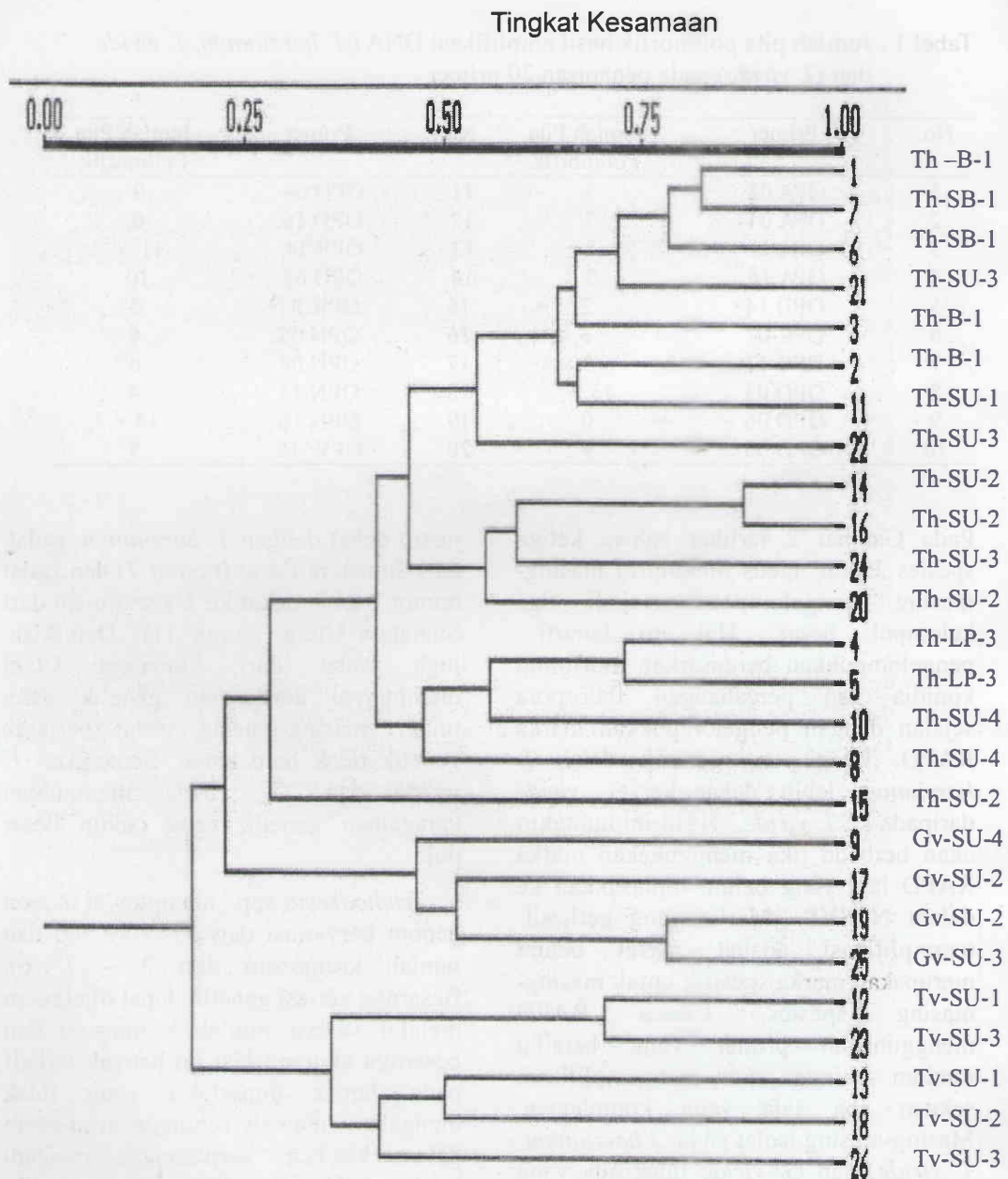
Tabel 1 . Jumlah pita polimorfik hasil amplifikasi DNA (*T. harzianum*, *T. viride* . dan *G. viride*) pada penapisan 20 primer

No.	Primer	Jumlah Pita Polimorfik	No.	Primer	Jumlah Pita Polimorfik
1	OPA 02	5	11	OPD 09	0
2	OPA 04	7	12	OPD 16	0
3	OPA 11	8	13	OPE 14	11 ✓
4	OPA 16	7	14	OPH 04	10
5	OPB 14	2	15	OPK 04	5
6	OPC 07	3	16	OPN 06	6
7	OPC 13	3	17	OPN 08	6
8	OPD 03	13 ✓	18	OPN 15	4
9	OPD 06	0	19	OPN 16	14 ✓
10	OPD 08	9	20	OPW 15	5

Pada Gambar 2 terlihat bahwa ketiga spesies Jamur agens biokontrol masing-masing mengelompok menjadi tiga kelompok besar. Hal ini berarti pengelompokan berdasarkan morfologi konidia dan percabangan fialospora sejalan dengan pengelompokan marka RAPD. Tetapi yang menarik adalah *T. harzianum* lebih dekat ke *G. viride* daripada ke *T. viride*. Hasil ini mungkin akan berbeda jika menggunakan marka RAPD lain yang belum dimasukkan ke dalam NTSYS. Marka yang berhasil teramplifikasi adalah masih belum merupakan marka spesifik untuk masing-masing spesies, karena RAPD menggunakan primer yang bersifat random sehingga akan mengamplifikasi sekuen apa saja yang komplemen. Masing-masing isolat pada *T. harzianum*, *T. viride*, dan *G. viride* tidak ada yang identik sama atau mempunyai keragaman genetik yang tinggi. *T. harzianum* isolat dari Banten /Jawa Barat tidak mengelompok pada kelompok yang sama. Isolat *T. harzianum* nomor 1

justro dekat dengan *T. harzianum* isolat dari Sumatera Barat (nomor 7) dan isolat nomor 2 lebih dekat ke *T. harzianum* dari Sumatera Utara (nomor 11). Demikian juga isolat dari Sumatera Utara mempunyai keragaman genetik yang tinggi, masing-masing isolat berjarak genetik tidak berdekatan. Sedangkan *T. viride* dan *G. viride* mempunyai keragaman genetik yang cukup besar pula.

Trichoderma spp., mempunyai ukuran genom bervariasi dari 31 – 39 Mb dan jumlah kromosom dari 3 – 7 (6). Besarnya variasi genetik dapat dijelaskan melalui variasi jumlah kromosom dan besarnya ukuran. Hal ini banyak terjadi pada Jamur imperfekti yang tidak mengalami meiosis sehingga kromosom dalam keadaan berpasangan menjadi tidak penting (7). Keragaman genetik juga akibat campur tangan manusia dengan transfer gen secara artifisial (11). Variasi genetik dalam *Trichoderma* terjadi karena mutasi, plastisitas kromosom, penyusunan kembali



Keterangan: Th: *T. harzianum*; Gv: *G. viride*; Tv: *T. viride*; B: Banten;
 SU: Sumatera Utara; SB: Sumatera Barat; LP: Lampung;
 1,2,3 : asal generasi kelapa sawit

Gambar 2. Dendrogram hubungan kekerabatan 26 jamur agens biokontrol

kromosom, dan perubahan kromosom akibat plasmid dan transposon. Rekombinasi aseksual secara alamiah terjadi pada *Trichoderma* melalui anastomosis yang diikuti heterokaryosis. Dalam heterokaryosis masing-masing sel dapat mempunyai ekstrakromosomal yang berbeda misalnya genom mitokondria, genom plasmid, dan invetron. Akibatnya komposisi sel baru yang terbentuk sangat berbeda dengan induknya atau disebut muncul strain baru.

Semua sel *Trichoderma* dan *Gliocladium* bersifat polinukleus, dengan beberapa sel mengandung jumlah *copy* inti sel yang sangat banyak. Meskipun ada beberapa konidia bersifat uninukleus (22). Sifat polinukleus ini, jelas akan mengakibatkan derajat kemunculan sifat baru yang sangat besar apabila terjadi heterokaryosis. Mutasi yang sering mengakibatkan perubahan sifat genetik adalah akibat sinar UV. Teknik ini sering digunakan untuk mendapatkan strain yang mempunyai sporulasi yang tinggi. Mekanisme lain yang terjadi pada *Trichoderma* yang mengakibatkan variasi genetik adalah paraseksualisme (2, 12). Dalam proses paraseksual terjadi fusi (karyogami) antara dua sel yang tidak sama melalui anastomosis. Akibatnya akan dihasilkan talus dengan nukleus yang heterokaryon yang terdiri atas kedua induknya. Kedua nukleus heterokaryon selanjutnya membentuk diploid rekombinan, yang hasilnya adalah nukleus diploid hetrozigot dan talus dengan homokaryon diploid mengalami *sorting out*. Pada mekanisme paraseksual terjadi pindah silang pada waktu mengalami pembelahan mitosis yang mengakibatkan perubahan

an struktur kromosom. Pada waktu pembentukan fase haploid terbentuklah strain baru dengan rekombinan yang baru. Mekanisme variasi genetik terbaru dari *Trichoderma* adalah akibat peran manusia yaitu dengan fusi protoplas atau penembakan gen ke *Trichoderma* (11). Gen yang telah berhasil ditransfer ke *Trichoderma* adalah gen *hygB* yang akan mengekspresikan sifat tahan terhadap antibiotik higromycin.

Implikasi dari variasi genetik yang besar pada *Trichoderma* dan *Gliocladium* ialah pada kemampuan adaptasi ekologi dan kebugaran, serta keefektifan pengendalian hayatinya. Implikasi positif dari sifat ini kemampuan adaptasi *Trichoderma* yang sangat besar yang dibuktikan mampu hidup pada daerah-daerah yang sangat ekstrem yaitu kondisi basah dan kering. Kedua jamur ini akan tahan terhadap perlakuan kimiawi misalnya herbisida. Contohnya ada strain baru *Trichoderma* yang tahan terhadap antibiotik higromycin. Implikasi negatifnya adalah apabila yang berubah mengakibatkan perubahan kemampuannya sebagai agens biokontrol, misalnya menjadi tidak mampu menghasilkan enzim kitinase dan glukonase.

KESIMPULAN

Jamur agens biokontrol terhadap *G. boninense* yang berupa *T. harzianum*, *T. viride*, dan *G. viride* mempunyai indeks keragaman yang rendah tetapi berdasarkan marka RAPD dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok besar dengan variasi genetik yang besar.

DAFTAR PUSTAKA

1. ABADI, A.L. 1987. Biologi *Gano-derma boninense* Pat pada kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) dan pengaruh beberapa mikroba tanah antagonistik terhadap pertumbuh-annya. Diser-tasi. PPS IPB. Bogor. 147 p.
2. BURNNETT, J.H. 1970. Myco-genetics. John Wiley & Sons. London. 375 p.
3. CHET, I. 1987. *Trichoderma* appli-cation, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne pathogenic fungi. In Chet, I (ed). Innovative Approaches to Plant Disease Control. John Wiley & Sons, New York pp. 137-160.
4. DHARMAPUTRA, O.S. 1989. Fungi antagonistic terhadap *Ganoder-ma boninense* Pat. penyebab penyakit busuk pang-kal batang pada kelapa sawit di kebun Adolina, Sumatera Utara. Laporan tahunan kerjasama penelitian P.P. marihat-Biotrop tahun 1989.
5. GHISALBERTI, E.L. and K. SIVASITHAMPARAM. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. Soil. Biol. Biochem. 23: 1011-1020.
6. GOLMAN, G.H., C.H. PELLIZ-ZON, M. MARINS, J.O. MCINER-NEY, and H.S. GOLMAN. 1998. *Trichoderma* spp. genome and gene structure. In. Harman, G.E. & C.P. Kubicek. (eds.) *Trichoderma* and *Gliocladium* Volume 1: Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis Ltd. UK. 393p.
7. HARMAN, G.E., C.K. HAYES, M. LORITO, R.M. BROADWAY, A. DI PIETRO, C. PETER-BAUER, and A. TRONSMO. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathol. 83: 313-318.
8. KUHLS, K., C. LIECKFELDT, G.J. SAMUELS, W. MEYER, C.P. KUBICEK, and T. BORNER. 1997. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibra-chiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Mycologia 89: 442-460.
9. LORITO, M., C.K. HAYES, A. DI PIETRO, S.L. WOO, and G.E. HARMAN. 1994. Purification, characterization and synergistic activity of a glucan B- glucosidase and N-acetyl-glucosamidase from *Trichoder-ma harzianum*. Phytopathology 84: 398-405.
10. LORITO, M., S.L. WOO, M. D; AMBROSIO, G.E. HARMAN, C.K. HAYES, C.P. KUBICEK, and F. SCALA. 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. Mol. Olant. Microb. Interact. 9 : 206-213.
11. MACH, R.L. and S. ZEILIN-GER. 1998. Genetic trans-formation of *Trichoderma* and *Gliocladium*. In. Harman, G.E. & C.P. Kubicek (eds.) *Tricho-derma* and *Gliocladium* Vol 1: Enzymes, biological control and comer-cial applications. Taylor & Francis Ltd. UK. 393p.
12. MIGHELI, O., J.M. WHIPPS, S.P. BUDGE, and J.M. LYNCH. 1995. Production of inter and intra-strain hybrids of *Trichoderma* spp. by protoplast fusion and evaluation of their biocontrol activity against soil-borne and foliar pathogens. J. Phytopathol. 143: 91-97.
13. MUTHUMEENAKSHI, S., P.R. MILLS, A.E. BROWN, and D.A. SEABY. 1994. Intra-specific molecular varia-tion among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in British Isles. Microbiology 140: 769-777.
14. OROZCOS- CASTILLO. 1994. Detec-tion of genetic diversity an selective gene introgression in coffee using RAPD Markers. The or. Appl. Genet. 87: 934-940.
15. PAPAIVIZAS, G.C. 1985. *T ri-choderma* and *Glioclodium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopath. 23: 23-54.
16. PURBA, R.Y., A. SIPAYUNG, and C. UTOMO. 1994. Anta-gonistic soil fungi on *Ganoderma boninense* Pat and the possibility of their application in oil palm estate. Bulletin PPKS. Vol 2, Januari-Maret 1994.
17. RIFAI, M. 1969. A revision of genus *Trichoderma*. Mycol. Pap. 116: 1-56.

18. SCHLICK, A., K. KUHLS, W. MEYER, E. LIECKFELDT, T. BORNER, and K. MESSNER. 1994. Finger-printing reveals gamma ray induced mutations in fungal DNA: implication for identification of patent strains of *Trichoderma harzianum*. *Curr. Genet.* 26: 74-78.
19. SCHIRBOCK, M., M. LORITO, Y. WANG, C.K. HAYES, I. ARISAN-ARTAC, F. SCALA, G.E. HARMAN, and C.P. KUBICEK. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolitic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanism involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against pathogenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4364-4370.
20. SOEPENA, H., R.Y. PURBA, and S.PRAWIROSUKARTO. 2000. A control strategy for basal stem rot (*Ganoderma*) on oil palm. In: Flood J, Bridge PD, Holder-ness M (eds). 2000. *Ganoderma* Diseases of perennial crops. CABI Publishing. Wallingford. UK. 83-88.
21. SEMANGUN, H. 1990. Penyakit-penyakit tanaman perkebunan di Indonesia. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 808 p.
22. TOYAMA, H.Y., A. YAMA-GUCHI, A. SHINMYO, and H. OKADA. 1984. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei* using immature conidia. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 363-368.
23. TREU, R. 1998. Macro fungi in oil palm plantations of South East Asia. *J. Gen. Mycol.* Vol. 12. Part 1.10-14.
24. VON ARX JA. 1987. Plant pathogenic fungi. *Beih. Nova Hedwigia* 87: 288.