

IDENTIFIKASI JAMUR ENDOFIT DAUN JARUM *Pinus radiata* MENGGUNAKAN METODE EKTRAKSI DNA SECARA LANGSUNG

Identification of endophyte fungi of Pinus radiata needles using direct DNA extraction methods

Istiana Prihatini

Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar Km 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta 55582
E-mail: istiana.prihatini@biotifor.or.id

ABSTRACT

Pinus radiata is the major softwood species planted in New Zealand and Australia. Endophyte fungi that have been extensively studied in conifers needles mainly based on fungal isolation and also rarely conducted in Pinus radiata. This study aimed to observe the optimum condition of P. radiata needles sample for direct extraction of fungal DNA and to identify the fungi associated with P. radiata needles in Plenty plantations by a direct PCR approach. Room temperature dried needles produced clear and consistent DNA amplification compare to fresh needles, and needles dried on drying room or drying machine. Capnodiales was the most diverse group and no fungal pathogen detected in this study. DNA sequence data from direct DNA extraction of P. radiata needles provided sufficient discrimination and identification of fungal species.

Key words: *Pinus radiata, endophyte fungi, direct DNA extraction, fungal identification*

ABSTRAK

Pinus radiata merupakan jenis pohon berkayu lunak yang banyak ditanam di Selandia Baru dan Australia. Jamur endofit telah banyak dipelajari pada daun jarum beberapa jenis konifer melalui teknik isolasi jamur namun belum banyak dilakukan pada jenis *Pinus radiata*. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kondisi daun jarum *P. radiata* yang optimal bagi proses ekstraksi DNA jamur endofit serta mengetahui jenis-jenis jamur endofit yang berasosiasi dengan daun jarum *P. radiata* di hutan tanaman Plenty melalui metode PCR secara langsung. Daun jarum yang telah dikeringkan pada suhu ruangan memberikan hasil amplifikasi DNA yang lebih jelas dan konsisten dibandingkan dengan daun yang masih segar serta daun yang telah dikeringkan pada ruang pengering maupun pada alat pengering. Pada penelitian ini, *Cap-nodiales* merupakan kelompok jamur yang paling banyak dijumpai serta tidak ditemukan jenis jamur patogen. Data sekuen DNA yang diperoleh melalui ekstraksi DNA secara langsung dari daun jarum *P. radiata* mampu memberikan perbedaan serta identifikasi bagi jenis-jenis jamur.

Kata kunci: *Pinus radiata, jamur endofit, ekstraksi DNA secara langsung, identifikasi jamur*

Tanggal diterima: 15 April 2014; Direvisi: 28 Mei 2014; Disetujui terbit: 3 Juni 2014

I. PENDAHULUAN

Pinus radiata merupakan jenis tanaman kayu lunak yang merupakan komoditas penting di beberapa negara terutama di belahan bumi bagian selatan. Jenis ini merupakan jenis eksotis yang ditanam secara luas misalnya di Selandia Baru, Chili, Australia, Afrika Selatan dan Argentina dengan total luasan hutan tanaman di seluruh dunia mencapai 4 juta ha (Mead, 2013). Di Selandia Baru, *P. radiata* merupakan jenis utama yang dikembangkan pada hutan tanaman dengan luasan mencapai 90% dari total hutan tanaman (NZFOA, 2012), sedangkan di Australia luasannya meliputi 42,7 % dari total hutan tanaman (ABARES, 2012).

Hutan tanaman *P. radiata* di beberapa bagian dunia saat ini sedang mengalami banyak serangan hama dan penyakit. Hama yang menyerang secara luas antara lain adalah *Sirex noctilio* yang dilaporkan di Australia (Collett and Elms, 2009) dan Amerika Serikat (USDAFS, 1993), kumbang *Ips grandicollis* dan *Hylastes ater* di Selandia Baru (Watson *et al.*, 2008), serta *Essigella californica* di Australia (May, 2004) dan Selandia Baru (Watson *et al.*, 2008). Jamur patogen yang menyerang *P. radiata* secara luas adalah *Dothistroma septosporum*,

Sphaeropsis sapinea (Mead, 2013) dan *Fusarium circinatum* (Ganley *et al.*, 2011). Adapun patogen yang menyerang hanya pada wilayah tertentu misalnya *Neonectria fuckeliana* di Selandia Baru (Ramsfield *et al.*, 2013), *Phytophthora ramorum* dan *Cyclaneusma minus* di Australia dan Selandia Baru (Mead, 2013), sedangkan di Tasmania ditemukan penyakit *spring needle cast* (SNC) yang belum diketahui penyebabnya (Podger and Wardlaw, 1990).

Dampak yang ditimbulkan oleh beberapa hama dan penyakit tersebut sangat signifikan secara ekonomis, misalnya hama *E. californica* di Australia mengurangi keuntungan sebesar kurang lebih AUD 21 juta per tahun (May, 2004), sedang penyakit *Cyclaneusma minus* di Selandia Baru menyebabkan kerugian sebesar NZD 38 juta per tahun (Watt *et al.*, 2011). Untuk itu diperlukan upaya untuk mengendalikan serangan hama dan penyakit secara efektif. Salah satunya adalah dengan melakukan identifikasi jenis organisme penyebab penyakit sebelum dampak serangan mulai terlihat. Jamur patogen umumnya dapat bersifat laten di dalam tubuh tanaman inang sebelum menimbulkan gejala penyakit (Moricca and Ragazzi, 2007).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kondisi daun jarum *P. radiata* yang optimal pada proses ekstraksi DNA jamur endofit secara langsung dari daun jarum *P. radiata* serta untuk mengetahui jenis-jenis jamur yang berasosiasi dengan daun jarum *P. radiata* di hutan tanaman Plenty melalui metode PCR secara langsung.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan penelitian

Penelitian ini menggunakan daun jarum *P. radiata* yang dikoleksi secara acak dari hutan tanaman yang berumur 4 tahun di daerah Plenty Tasmania. Satu cabang daun dipilih secara acak untuk dipergunakan dalam beberapa perlakuan yang berbeda yaitu:

1. disimpan pada suhu ruang (30°C) selama 24 jam dan 96 jam
2. dikeringkan pada mesin pengering (45°C) selama 24 jam
3. dikeringkan pada ruangan pengering (suhu 38°C) selama 24 jam dan 72 jam
4. material segar yang disimpan secara langsung pada suhu (-80°C).

Pada setiap perlakuan digunakan sebanyak tiga tangkai daun (berisi 3 helai daun jarum).

B. Metode Penelitian

1. Ekstraksi DNA

Semua sampel daun jarum yang sudah disimpan dalam kondisi yang berbeda kemudian dipotong menjadi ukuran 0,5 cm dan digerus menggunakan mortar dan alat pengerus porselin dengan bantuan nitrogen cair. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan buffer SDS (Raeder and Broda, 1985) sesuai protokol yang digunakan pada Glen *et al.* (2002).

2. Amplifikasi PCR

Reaksi PCR dilakukan menggunakan Mangotaq (Bioline) dengan konsentrasi akhir: 67mM Tris-HCl, pH 8,8; 16mM (NH₄)₂SO₄ (pada 5x *reaction buffer* yang disediakan oleh Bioline); 2,0 mM magnesium chloride (Promega); 200 µM deoxynucleotide triphosphate (Bioline); 0,25 µM *oligonucleotide primer* (Geneworks); 0,25 unit Biotaq DNA *polymerase* (Bioline); 10mg/ml of *bovine serum albumin* (Fisher Biotec); 10µl DNA yang sudah diencerkan 20x menggunakan TE sebagai template DNA dan ditambahkan air steril (Astra Zeneca) hingga volume akhir mencapai 50 µl. Primer yang digunakan pada penelitian ini adalah primer ITS4A (Larena *et al.*, 1999) dan ITS5 (White *et al.*, 1990).

Amplifikasi PCR dilakukan pada mesin Peltier Thermal Cycler PTC-225 (MJ *Research*) dengan pemanasan awal pada suhu 95°C selama 3 menit dan amplifikasi sebanyak 35 siklus yang terdiri dari proses denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, proses *annealing* pada suhu 55°C selama 30 detik dan pemanjangan (*extention*) pada suhu 72°C selama 2 menit dan pemanjangan akhir (*final extention*) selama 7 menit pada suhu 72°C.

3. Elektroforesis

Produk hasil amplifikasi PCR dipisahkan melalui proses elektroforesis pada gel agarose 1% (*Fisher Biotech*) pada 10 volts/cm selama 30 menit menggunakan MI-DEAR 120 *High Performance Gel System* (*Biokeystone*). Gel agarose kemudian divisualisasi pada *transilluminator* (Vilber Lourmat) setelah dilakukan *staining* menggunakan *Ethidium Bromide* 0,5ug/ml (*MOBIO-Geneworks*) selama 20 menit dan gambar diambil menggunakan kamera (Vilber Lourmat) yang terhubung dengan *transilluminator*.

4. Kloning DNA

Kloning terhadap DNA hasil PCR dilakukan untuk memisahkan DNA

setiap individu jamur yang berbeda yang tercampur di dalam sampel daun yang sama. Proses kloning dilakukan menggunakan GEMâ-T Easy Vector (Promega). Hasil amplifikasi dari proses PCR dipurifikasi terlebih dahulu menggunakan *UltraCleanâ PCR Clean-up Kit* (MO BIO) sesuai dengan protocol yang disediakan oleh perusahaan serta dipresipitasi dengan menambahkan 5M NaCl dan 100 µl ethanol 100%. DNA kemudian digunakan pada proses ligasi. Reaksi ligasi dilakukan pada hari yang sama dengan PCR dan purifikasi DNA, mengikuti prosedur yang disediakan oleh perusahaan. Reaksi ligasi disimpan pada suhu 5°C selama sekitar 24 jam sebelum dilakukan proses transformasi. Setelah proses transformasi pada sel kompeten JM109 (Promega) sesuai dengan protocol yang disediakan oleh perusahaan, sebanyak 100 µl hasil reaksi transformasi kemudian ditumbuhkan pada media agar LB padat dengan penambahan Ampicillin, IPTG dan X-gal serta diinkubasi pada suhu 37 °C semalam. Koloni sel bakteri hasil transformasi yang memiliki plasmid dengan sisipan DNA (berwarna putih) diambil menggunakan tusuk gigi steril dan disuspensikan dalam 50 µl TE. Suspensi sel bakteri dalam TE ini kemudian digunakan

secara langsung dalam proses PCR tahap kedua dengan prosedur yang sama dengan PCR pertama (bagian II.B.2) menggunakan primer ITS1 dan ITS4 (White *et al.*, 1990).

5. DNA Sequencing

Hasil amplifikasi dari reaksi PCR tersebut kemudian dikirim ke Macrogen Ltd (Seoul, Korea) untuk dilakukan sekuensing menggunakan primer ITS1 (White *et al.* 1990).

6. Analisis data hasil *sequencing*

Gambar kromatogram hasil sekuensing yang diperoleh dari website Macrogen (<http://dna.macrogen.com/eng/>) dianalisa dan jika diperlukan dilakukan pengeditan menggunakan program ChromasPro version 1.34 yang dapat diunduh secara gratis (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>). Sekuense DNA jamur kemudian dicocokkan dengan sekuen jamur yang tersedia pada database nukleotida National Center for Biotechnology Information (NCBI) menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang dikembangkan oleh Altschul *et al.*, (1997). Hasil pencocokan identitas jamur tersebut kemudian dikelompokkan sesuai dengan tingkat kemiripannya kemudian setiap

kelompok analisis menggunakan program ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Setiap polimorfisme yang teramati pada setiap kelompok sebelumnya dicek ulang terlebih dahulu pada gambar kromatogram untuk melihat adanya hasil pembacaan basa yang salah. Identitas jenis jamur serta *Operational taxonomic units* (OTUs) ditentukan berdasarkan tingkat kemiripan sekuen dengan jenis jamur yang sudah dikenal yang tersedia pada database melalui analisis filogenetik menggunakan pendekatan *maximum likelihood* dengan program DNAML yang tersedia pada paket program PHYLIP (Felsenstein, 1989). Gambar pohon filogenetik dibuat menggunakan program TreeView (Page, 1996) dan diedit menggunakan program Mega4 (Tamura *et al.*, 2007).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

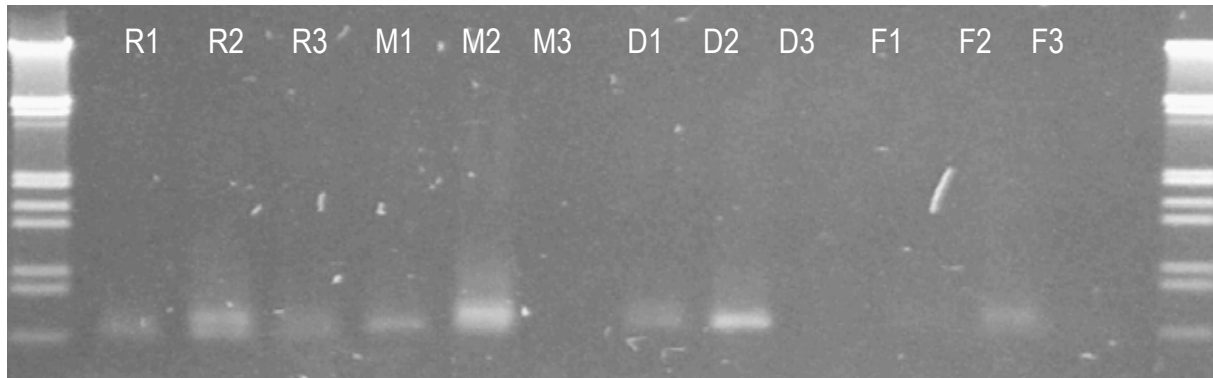
A. Hasil

1. Ekstraksi DNA menggunakan 4 kondisi sampel daun yang berbeda

Hasil amplifikasi PCR menunjukkan bahwa sampel daun yang telah dikeringkan (layu) memberikan hasil pita DNA yang lebih jelas dibandingkan dengan sampel

daun yang masih basah atau segar (Gambar 1). Pengeringan daun yang dilakukan di dalam suhu ruangan memberikan hasil yang lebih konsisten dibandingkan dengan

2 metode pengeringan yang lain. DNA yang didapatkan dengan metode pengeringan dalam suhu ruangan tersebut digunakan dalam kegiatan *cloning* dan sekuensing.



Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA jamur dari daun jarum sehat *Pinus radiata* dari beberapa daun yang berbeda serta metode penyimpanan yang berbeda; R=suhu ruang (30°C); M = mesin pengering (45°C); D= ruang pengering (38°C) dan F= daun basah. Nomor 1,2 dan 3 menunjukkan sampel daun yang berbeda

Hasil amplifikasi PCR dari sampel daun yang telah dikeringkan pada suhu ruangan kemudian digabungkan menjadi satu dan digunakan sebagai sampel pada reaksi *cloning* dan PCR tahap kedua serta dilakukan sekuensing DNA yang dilanjutkan dengan identifikasi jenis jamur.

2. Sekuensing DNA jamur yang diekstraksi pada daun jarum *P. radiata*

Dua puluh empat sel bakteri hasil kloning yang dipilih secara acak digunakan dalam proses sekuensing. Hasil analisa sekuensing terhadap DNA jamur yang diekstraksi dari daun jarum *Pinus radiata* yang telah dikeringkan pada suhu ruangan disajikan pada Tabel 1.

Hanya satu jenis jamur yaitu *Penicillium corylophilum* yang dapat teridentifikasi melalui sekuen ITS melalui tingkat kemiripan yang tinggi (99%) dengan sekuen dari database NCBI. Beberapa jenis jamur teridentifikasi dengan kemiripan yang cukup tinggi (98-99%) terhadap lebih dari satu jenis jamur misalnya *Cladosporium*, *Catenulostroma* dan *Lophodermium* dapat diketahui kemiripan sekuensnya dengan jamur lain hingga tingkat spesiesnya. Beberapa sampel lain memiliki kemiripan yang rendah (< 95%) terhadap sekuen ITS dari jamur lain pada database.

Tabel 1. Hasil analisis sekuensing DNA jamur yang diekstraksi secara langsung dari daun *P. radiata* yang dikoleksi pada hutan tanaman di Plenty Tasmania

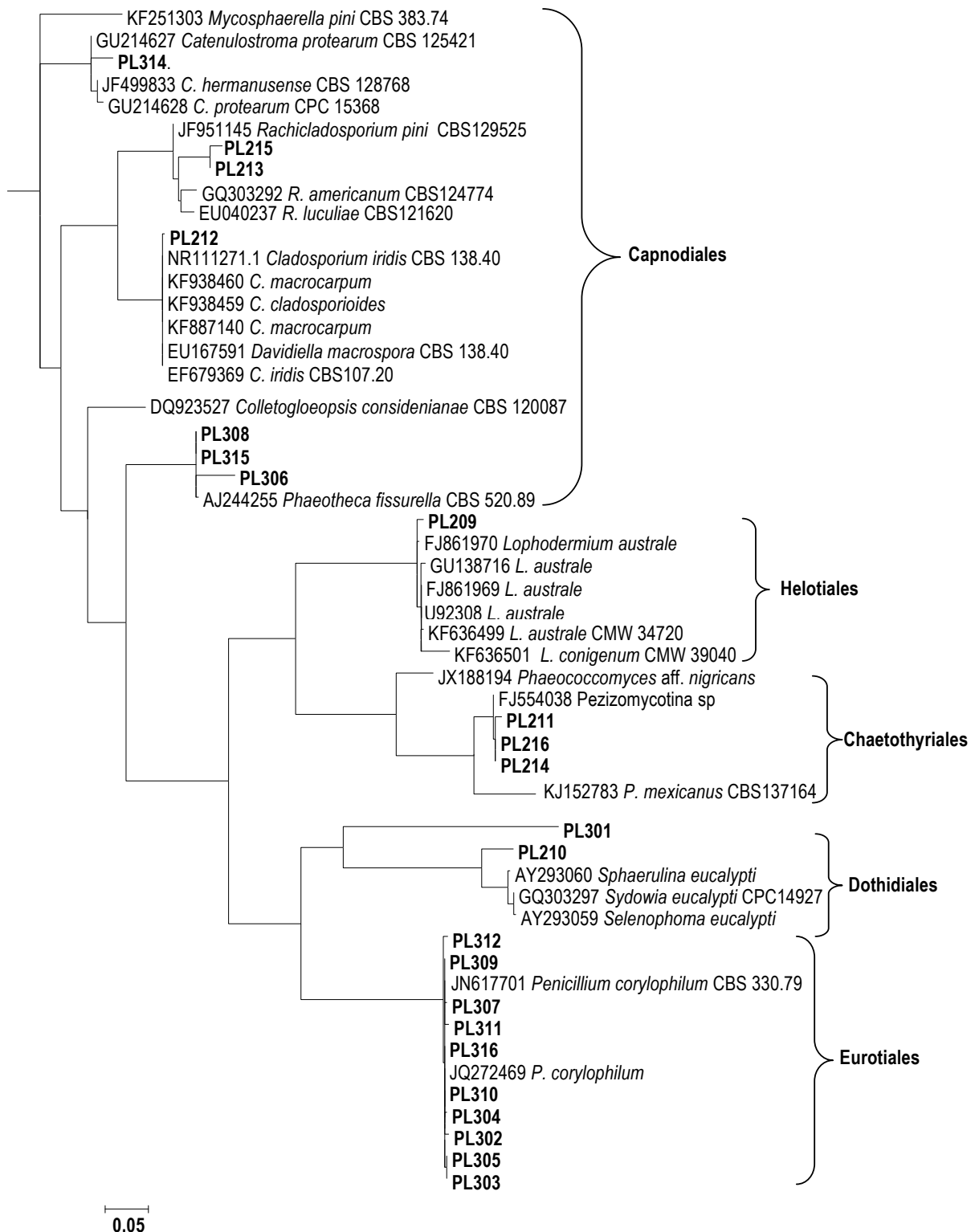
Identitas klon	Hasil pencarian menggunakan program BLAST	Familia
Plenty 209	98-99% sesuai dengan beberapa jenis <i>Lophodermium</i> termasuk <i>L. conigenum</i> no akses pada NCBI FJ861975 dan <i>L. australe</i> CMW 34720 no akses FJ861970.	Helotiales
Plenty 210	92% sesuai dengan beberapa jenis Dothidiales termasuk <i>Sphaerulina eucalypti</i> no akses pada NCBI AY293060, <i>Selenophoma eucalypti</i> no akses AY293059 dan <i>Sydowia eucalypti</i> CPC14927 no akses GQ303297	Dothideales
Plenty 211, 214	99% sesuai dengan uncultured Pezizomycotina no akses pada NCBI FJ554038 dan hanya mendekati 87% sesuai dengan beberapa jenis <i>Phaeococcomyces</i> termasuk <i>P. mexicanus</i> strain CPC 22069 no akses KJ152783 dan <i>P. aff. nigricans</i> no akses JX188194	Chaetothyriales
Plenty 212	99% sesuai dengan beberapa jenis <i>Cladosporium</i> , termasuk <i>C. cladosporioides</i> no akses pada NCBI KF938459, <i>C. macrocarpum</i> no akses KF887140 dan <i>C. iridis</i> no akses KF938460	Capnodiales
Plenty 213, 215	hingga 95% sesuai dengan <i>Rachicladosporium</i> , termasuk <i>R. pini</i> CPC16770 no akses pada NCBI JF951145, <i>R. luculiae</i> strain CPC11407 no akses EU040237 dan <i>R. americanum</i> CBS124774 no akses GQ303292	Capnodiales
Plenty 216	99% sesuai dengan uncultured Pezizomycotina no akses pada NCBI FJ554038 dan hanya mendekati 87% sesuai dengan beberapa jenis <i>Phaeococcomyces</i> termasuk <i>P. mexicanus</i> strain CPC 22069 no akses KJ152783 dan <i>P. aff. nigricans</i> no akses JX188194	Chaetothyriales
Plenty 301	Hingga 94% sesuai dengan <i>Preussia</i> , termasuk <i>P. tetramera</i> no akses pada NCBI GQ203792, <i>P. dubia</i> no akses GQ203777 dan <i>Sporormiella irregularis</i> no akses GQ203780	Pleosporales
Plenty 302, 303, 304, 305, 307, 309, 310, 311, 312, 316	99% sesuai dengan <i>Penicillium corylophilum</i> no akses pada NCBI KF170363, KC692220 dan JQ272469	Eurotiales
Plenty 306 , 308, 315	95% sesuai dengan <i>Phaeotheca fissurella</i> CBS 520.89 no akses pada NCBI AJ244255 dan hingga 80% sesuai dengan beberapa jenis Capnodiales lain termasuk <i>Teratosphaeria consideniana</i> CPC13032 no akses GQ852791 dan <i>Colletogloeopsis consideniana</i> CBS 120087 no akses DQ923527	Capnodiales
Plenty 314	98% sesuai dengan beberapa jenis <i>Catenulostroma</i> termasuk <i>C. protearum</i> strain CPC 15369 no akses pada NCBI GU214629 dan <i>C. hermanusense</i> strain CBS 128768 no akses JF499833	Capnodiales

3. Analisis filogenetik

Analisis filogenetik (Gambar 2) dilakukan terhadap semua sampel jamur yang teramplifikasi dari daun jarum *P. radiata*. Sekuen dari database yang memiliki kemiripan dengan sekuen sampel yang

dianalisis juga dimasukkan dalam analisis.

Sekuen *Mycosphaerella pini* (sinonim dengan *Dothistroma pini*) yang didapat dari database NCBI yang merupakan salah satu jenis jamur penyebab penyakit pada *P. radiata* juga disertakan sebagai outgroup.



Gambar 2. Analisis filogenetik menggunakan pendekatan *maximum likelihood* terhadap semua sekuen ITS dari sampel DNA jamur (PL= Plenty) yang teramplifikasi dari daun *Pinus radiata*. Sekuense dari jamur *Mycosphaerella pini* digunakan sebagai outgroup dalam analisis ini

Analisis filogenetik memberikan gambaran lebih jelas mengenai kedudukan semua sampel DNA jamur terhadap sampel lainnya dan juga terhadap sekuense yang diperoleh dari database. Sebagian besar sekuen database yang digunakan dalam penelitian ini merupakan sekuense dari isolat jamur yang sudah diketahui identitasnya menggunakan karakter morfologi dan kultur atau herbarium sampelnya telah disimpan di pusat database di CBS (*The Centralbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre*).

B. Pembahasan

Penelitian tentang jamur endofit yang hidup pada berbagai jenis konifer telah banyak dilakukan, namun umumnya jamur tersebut diisolasi terlebih dahulu dan ditumbuhkan pada media agar (Romeralo *et al.*; 2012, Yoo and Eom, 2012; Qadri *et al.*, 2014). DNA jamur yang hidup pada daun jarum *P. radiata* dapat diekstraksi dan diidentifikasi secara langsung dari daun jarum menggunakan metode sederhana dengan buffer SDS yang dapat dipakai untuk mengekstraksi DNA jamur dari badan buah dan isolat atau kultur jamur (Sulistiyawati, 2004). Daun jarum yang telah dilayukan memberikan hasil amplifikasi yang lebih

jelas dibandingkan daun yang masih segar. Sebelum penelitian ini dilaksanakan, ekstraksi DNA menggunakan sampel berupa daun segar telah dilakukan dengan beberapa metode ekstraksi termasuk menggunakan DNA *extraction Kit* yang beredar di pasaran, namun tidak didapatkan hasil yang konsisten jika melibatkan sampel dalam yang besar (data tidak dipublikasi). Penggunaan daun yang telah dilayukan atau dikeringanginkan juga memberikan kelebihan yaitu kemudahan dalam proses penyimpanan sampel, karena setelah daun layu dapat disimpan di dalam amplop kertas pada suhu ruangan (untuk penyimpanan jangka pendek) atau disimpan dalam kantong plastik pada lemari beku suhu -40°C (untuk penyimpanan jangka panjang).

Jenis jamur yang teridentifikasi pada penelitian ini merupakan anggota dari berbagai familia seperti Eurotiales (ordo Eurotiomycetes), Capnodiales (ordo Dothideomycetes), Helotiales (ordo Leotiomycetes), Pleosporales (ordo Dothideomycetes), dan Chaetothyriales (ordo Chaetothyriomycetes). *Penicillium corylophilum* merupakan jenis jamur yang paling banyak teridentifikasi (10 sampel) pada penelitian ini. Jenis jamur ini ditemukan sebagai endofit pada beberapa jenis tanaman

antara lain *Withania somnifera* (Khan *et al.*, 2010) serta beberapa jenis tanaman obat seperti *Launea spinosa* dan *Teucrium polium* (Selim *et al.*, 2011). Pada hutan *Pinus*, jamur ini ditemukan sebagai saprofit pada sampel tanah (Grantina-Ievina *et al.*, 2013), serta pada serasah daun (Osono *et al.*, 2006). Sebagai endofit jenis tersebut ditemukan pada batang *Pinus ponderosa* (Kurth *et al.*, 2013). Beberapa jenis *Penicillium* lain juga ditemukan sebagai jamur endofit pada batang *Pinus wallichiana* (Qadri *et al.*, 2014),

Capnodiales memiliki jenis paling banyak yang ditemukan pada studi ini, meliputi jenis *Catenulostroma* sp., *Cladosporium* sp, *Phaeotheca fissurella* dan *Rachicladosporium* sp. Beberapa penelitian pada jenis Pinus yang berbeda juga menemukan jenis-jenis jamur tersebut sebagai endofit pada daun jarum (Ganley, 2004; Arnold, 2007; Qadri *et al.*, 2014). Dothidiomycetes tercatat sebagai ordo yang memiliki jumlah jenis terbanyak serta frekuensi yang paling besar pada daun jarum (Botella and Diez, 2011; Qadri *et al.*, 2014). Sordariomycetes merupakan ordo yang umumnya menempati urutan kedua setelah Dothidiomycetes, namun dalam penelitian ini anggota dari kelompok ini tidak

satupun teridentifikasi. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Arnold *et al.* (2007) juga tidak berhasil mengidentifikasi jenis Sordariomycetes melalui teknik identifikasi DNA jamur secara langsung dari sampel daun, meskipun ditemukan dalam jumlah jenis yang besar pada penggunaan teknik isolasi. Hal ini mungkin disebabkan karena jenis Sordariomycetes memiliki biomassa yang kecil didalam sampel daun namun memiliki pertumbuhan yang cepat sehingga mudah teridentifikasi melalui teknik isolasi jamur dengan menumbuhkan miselium pada media agar.

Pada penelitian ini jenis jamur patogen yang umumnya ditemukan pada *P. radiata* di belahan bumi bagian selatan seperti *Dothistroma pini* (Bradshaw, 2004), *Lophodermium pinastri* (Choi and Simpson, 1991) maupun *Cyclaneusma minus* (Bulman *et al.*, 2008) tidak terdeteksi. Hal ini mungkin disebabkan karena sampel daun yang digunakan adalah sampel daun yang masih berwarna hijau dan terlihat sehat serta diambil dari pohon *P. radiata* yang masih muda (berumur 4 tahun), sedangkan jamur patogen umumnya muncul setelah tanaman *P. radiata* berumur lebih dari 8 tahun (Bulman *et al.*, 2008).

IV. KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa:

1. DNA jamur dapat diekstraksi secara langsung dari daun jarum *Pinus radiata*.
2. Daun jarum *P. radiata* yang sudah dikeringkan / dilayukan akan memberikan hasil amplifikasi DNA yang lebih jelas daripada daun yang masih segar / basah.
3. Pengeringan pada suhu ruangan memberikan hasil amplifikasi DNA yang lebih jelas dibandingkan pengeringan metode lainnya.
4. Jamur yang tumbuh pada daun jarum *P. radiata* yang teridentifikasi pada penelitian ini adalah dari kelompok Eurotiales, Capnodiales, Helotiales, Pleosporales, dan Chaetothyriales.
5. Capnodiales memiliki jumlah jenis yang paling banyak ditemukan, pada penelitian ini
6. Tidak ditemukan jenis jamur patogen pada penelitian ini.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian besar yang dibiayai oleh Australian Research Council, Forestry Tasmania, Taswood Growers, Norske – Skog, Forest NSW and Hosking Ltd. New Zealand. Penulis mengucapkan terimakasih kepada Anna Smith yang telah membantu dalam pengambilan sampel di lapangan dan kepada Morag Glen yang telah memberikan bimbingan teknis di laboratorium serta dalam analisa data.

DAFTAR PUSTAKA

- ABARES 2012. Agricultural commodity statistics 2012. Canberra: Australian Bureau of Agricultural and Resource Economics and Sciences.
- Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zheng, Z., Miller, W. & Lipman, D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.
- Arnold, A. E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21, 51-66.
- Arnold, A. E., Henk, D. A., Eells, R. L., Lutzoni, F. & Vilgalys, R. 2007. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia*, 99, 185-206.
- Botella, L. & Diez, J. J. 2011. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity*, 47, 9-18.
- Bradshaw, R. E. 2004. *Dothistroma* (red-band) needle blight of pines and the dothistromin toxin: a review. *Forest Pathology*, 34, 163-185.
- Bulman, L. S., Ganley, R. J. & Dick, M. 2008. Needle diseases of radiata pine in New Zealand.

- Client Report*. Rotorua: SCION.
- Choi, D. & Simpson, J. A. 1991. Needle cast of *Pinus radiata* in New South Wales. *Australian Journal of Botany*, 39, 137-152.
- Collett, N. G. & Elms, S. 2009. The control of sirex wood wasp using biological control agents in Victoria Australia. *Agricultural and Forest Entomology*, 11, 283-294.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5, 164-166.
- Ganley, R. J., Brunfeldt, S.J. and Newcombe, G. 2004. A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, 101, 7-12.
- Ganley, R. J., Watt, M. S., Kriticos, D. J., Hopkins, A. J. M. & Manning, L. K. 2011. Increased risk of pitch canker to Australasia under climate change. *Australasian Plant Pathology*, 40, 228-237.
- Glen, M., I. C. Tommerup, N. L. Bougher, and P.A. O' Brien 2002. Are Sebacinaceae common and widespread ectomycorrhizal associates of *Eucalyptus* species in Australian forests? *Mycorrhiza*, 12, 243-247.
- Grantina-Ievina, L., Kasparinskis, R., Tabors, G. & Nikolajeva, V. 2013. Features of saprophytic soil microorganism communities in conifer stands with or without *Heterobasidion annosum* sensu lato infection: a special emphasis on *Penicillium* spp. . *Environmental and Experimental Biology*, 11, 23-38.
- Khan, R., Shahzad, S., Iqbal choudhary, M., Khan, S. A. & Ahmad, A. 2010. Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania somnifera*. *Pakistan Journal of Botany*, 42, 1281-1287.
- Kurth, V. J., Fransioli, N., Fule, P. Z., Hart, S. C. & Gehring, C. A. 2013. Stand-replacing wildfires alter the community structure of wood-inhabiting fungi in southwestern ponderosa pine forests of the USA. *Fungal Ecology*, 6, 192-204.
- Larena, I., Salazar, O., Gonzales, V., Julian, M. C. & Rubio, V. 1999. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *Journal of Biotechnology*, 75, 187-194.
- May, B. M. 2004. Assessment of the causality of *Essigella*-ascribed defoliation of mid-rotation radiata pine and its national impact in terms of cost of lost wood production. *In: Project, R. (ed.) PN04-4002*. Melbourne, Australia: Forest and Wood Products Research and Development Corporation.
- Mead, D. J. 2013. Sustainable management of *Pinus radiata* plantations. *FAO Forestry Paper*. Rome: FAO.
- Moricca, S. & Ragazzi, A. 2007. Fungal endophytes in Mediterranean oak forest: a lesson from *Discula quercina* *Phytopathology*, 98.
- NZFOA 2012. New Zealand Forest Industry Facts and Figures 2011/2012. *In: Association, N. Z. F. O. (ed.)*. Wellington.
- Osono, T., Hirose, D. & Fujimaki, R. 2006. Fungal colonization as affected by litter depth and decomposition stage of needle litter. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 2743-2752.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12, 357-358.
- Podger, F. D. & Wardlaw, T. J. 1990. Spring needle cast of *Pinus radiata* in Tasmania. I. Symptoms, distribution and association with *Cyclaneusma minus*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 20, 184-205.
- Qadri, M., Rajput, R., Abdin, M. Z., Vishwakarma, R. A. & Riyaz-UI-Hassan, S. 2014. Diversity, molecular phylogeny, and bioactive potential of fungal endophytes associated with the Himalayan blue pine (*Pinus wallichiana*). *Microbial Ecology*, 67, 877-887.
- Raeder, U. & Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1, 17-20
- Ramsfield, T. D., Power, M. W. P. & Kimberley, M. O. 2013. The relationship between pruning and the incidence of *Neonectria fuckeliana* in *Pinus radiata*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 43, 1-6.
- Romeralo, C., Diez, J. J. & Santiago, N. F. 2012. Presence of fungi in Scots pine needles found to correlate with air quality as measured by bioindicators in northern Spain. *Forest Pathology*, 42, 443-453.
- Selim, K., El-Beih, A., AbdEl-Rahman, T. & El-Diwany, A. 2011. Biodiversity and antimicrobial activity of endophytes associated with Egyptian medicinal plants. *Mycosphere*, 2, 669-678.
- Sulistiyawati, P. 2004. Identifikasi jenis jamur dengan teknik molekuler. *Jurnal Penelitian Tanaman Hutan*, 1, 2.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology Evolution*, 24, 1596-1599.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix

- choice. *Nuc. Acid. Res.*, 22 4673-4680.
- USDAFS 1993. Pest risk assessment of the importation of *Pinus radiata*, *Nothofagus dombeyi*, and *Laurelia philippiana* logs from Chile. *Miscellaneous Publication* Washington, D. C United States Department of Agriculture, Forest Service.
- Watson, M. C., Kriticos, D. J., Drayton, G. M., Teulon, D. A. J. & Brockerhoff, E. G. 2008. Assessing the effect of *Essigella californica* on *Pinus radiata* at two sites in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 61, 177-184.
- Watt, M., Rolando, C., Palmer, D. & Bulman, L. 2011. Predicting the severity of *Cyclaneusma minus* on *Pinus radiata* in New Zealand. *Forest Health News*. Rotorua: SCION.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*, Academic Press, Inc.
- Yoo, J. J. & Eom, A. H. 2012. Molecular identification of endophytic fungi isolated from needle leaves of conifers in Bohyeon Mountain, Korea. *Mycobiology*, 40, 231-235.