

Research Article

Pengenalpastian dan Pencirian Gen Mengekod Protein Pengangkut Feromon, Ste6 Kulat *Ganoderma boninense*

Anis Farhan Fatimi Ab. Wahab¹, Abdul Munir Abdul Murad², Farah Diba Abu Bakar², Izwan Bharudin^{2*}

¹Geoinformatics, Genomics & Bioinformatics Department, FGV R&D Sdn. Bhd., FGV Innovation Centre (Biotechnology), PT. 23417 Lengkok Teknologi, 71760 Bandar Enstek, Negeri Sembilan, Malaysia.

²Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia.

*Corresponding author: ibb@ukm.edu.my

ABSTRACT

Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) is a major crop commodity in Malaysia and Indonesia, contributing more than 80% of global palm oil production; however, its productivity is threatened by basal stem rot (BSR) disease caused primarily by *Ganoderma boninense*, which results in economic losses of up to USD 500 million annually. Genetic variation in this fungus, generated through sexual mating processes, produces strains with differing levels of virulence, thereby complicating disease management strategies. In pathogenic fungi, mating genes act as key virulence factors as they regulate morphogenesis, proliferation, and the transition from a saprophytic to a pathogenic lifestyle. Although the tetrapolar mating system of *G. boninense*, involving the *matA* and *matB* mating-type loci, has been identified, the pheromone transporter protein Ste6—an essential component of this system—has not yet been reported. This study aimed to identify and characterize the Ste6 protein in *G. boninense* using bioinformatic approaches and gene expression analysis. The findings revealed that the Ste6 amino acid sequence is highly conserved within the *Ganoderma* genus, with sequence identity exceeding 90%, and gene expression analysis confirmed its involvement in the mating system. Overall, this study provides the first report of the Ste6 protein in *G. boninense*. Although its high level of conservation suggests that Ste6 may not be a suitable target for antifungal compound development, the discovery highlights its strong potential as a biomarker for species identification of *G. boninense*, offering a faster and more accurate alternative to internal transcribed spacer (ITS)-based sequencing.

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) merupakan tanaman komoditi utama di Malaysia dan Indonesia yang menyumbang lebih 80% pengeluaran minyak sawit dunia, namun produktiviti tanaman ini terancam oleh penyakit reput pangkal batang (BSR) yang disebabkan oleh *Ganoderma boninense* sebagai patogen utama. Penyakit ini menyebabkan kerugian ekonomi yang besar kepada kedua-dua negara, dengan anggaran kerugian mencecah USD 500 juta setahun. Variasi genetik dalam kulat ini, yang dihasilkan melalui proses pengawanan seksual, menghasilkan strain kulat dengan tahap kevirulenan berbeza dan menyukarkan operasi pengurusan penyakit. Dalam sistem pengawanan kulat patogen, gen pengawanan bertindak sebagai faktor kevirulenan utama kerana mengawal atur morfogenesis, proliferasi, serta peralihan gaya hidup daripada saprofit kepada patogen. Walaupun sistem pengawanan tetrapolar *G. boninense* yang melibatkan lokus jenis pengawanan *matA* dan *matB* telah dikenal pasti, protein pengangkut feromon Ste6 yang merupakan komponen penting sistem pengawanan ini masih belum pernah dilaporkan. Kajian ini dilakukan untuk mengenal pasti dan mencirikan protein Ste6 bagi kulat *G. boninense* menggunakan pendekatan bioinformatik dan analisis pengekspresan gen. Hasil kajian menunjukkan bahawa jujukan asid amino Ste6 sangat terpelihara dalam genus *Ganoderma* dengan identiti melebihi 90%, dan analisis pengekspresan gen mengesahkan penglibatannya dalam sistem pengawanan. Secara keseluruhannya, kajian ini melaporkan buat kali pertama kehadiran protein Ste6 dalam *G. boninense*, dan walaupun tahap kepuliharaan yang tinggi menunjukkan ia kurang sesuai dijadikan sasaran dalam pembangunan sebatian antikulat, penemuan ini membuka potensi besar untuk membangunkan Ste6 sebagai biopenanda bagi pengesanan spesies *G. boninense*, sekali gus menawarkan alternatif yang lebih cepat dan tepat kepada pendekatan berasaskan penjujukan penjarak transkripsi dalaman (ITS).

Key words: basal stem rot, *Ganoderma boninense*, mating, oil palm, pheromone exporter, tetrapolar

Kata kunci: *Ganoderma boninense*, kelapa sawit, pengawanan, pengangkut feromon, penyakit reput pangkal batang, tetrapolar

Article History

Accepted: 13 August 2026

First version online: 24 September 2026

Cite This Article:

Ab Wahab, A.F.F., Abdul Murad, A.M., Abu Bakar, F.D. & Bharudin, I. 2026. Pengenalpastian dan pencirian gen mengekod protein pengangkut feromon, Ste6 kulat *Ganoderma boninense*. Malaysian Applied Biology, 55(3): 102-113. <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v55i3.3647>

Copyright

© 2026 Malaysian Society of Applied Biology

PENGENALAN

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) merupakan komoditi pertanian utama di Malaysia dan Indonesia, yang bersama-sama menyumbang kira-kira 85% daripada pengeluaran minyak sawit dunia (Bentivoglio *et al.*, 2018; Midot *et al.*, 2019). Tanaman ini mempunyai kelebihan berbanding tanaman lain kerana jangka hayat produktif yang panjang (25–30 tahun) serta potensi hasil yang tinggi, iaitu sekitar 1 tan minyak mentah bagi setiap 0.26 hektar, dengan 8–13 tandan segar setahun seberat 15–25 kg setiap tandan (Maluin *et al.*, 2020). Oleh itu, tahap kesihatan pokok kelapa sawit merupakan salah satu faktor penting bagi mendapatkan hasil yang maksimum (Yusoff *et al.*, 2021). Walau bagaimanapun, produktiviti kelapa sawit diancam oleh haiwan perosak dan penyakit yang kebanyakannya disebabkan oleh kulat patogen.

Penyakit utama bagi kelapa sawit adalah penyakit reput pangkal batang (*basal stem rot*, BSR) yang disebabkan oleh kulat *G. boninense* sebagai patogen utama diikuti oleh *Ganoderma zonatum* dan *Ganoderma miniatocinctum* (Bharudin *et al.*, 2022). Simptom-simptom BSR termasuklah pucuk daun yang tidak mengembang, pengeluaran pucuk berganda, pelepah kuning, petiol patah, pereputan pangkal batang dan kewujudan jasad buah kulat (Chong *et al.*, 2017; Rees *et al.*, 2009). Penyakit ini boleh memendekkan jangka hayat pokok, mengurangkan hasil sehingga 80% dan meningkatkan kos pengurusan ladang, dengan kerugian ekonomi mencecah sehingga USD 500 juta setahun di Malaysia dan Indonesia (Hushiarian *et al.*, 2013; Paterson, 2019; Rebitanim *et al.*, 2020).

Penyebaran BSR berlaku melalui tiga cara utama: penyebaran basidiospora, persentuhan akar sihat dengan inokulum sekunder, dan persentuhan akar dengan akar yang telah terinfeksi (Bridge *et al.*, 2003; Grinn-Gofroń and Strzelczak, 2011; Miller *et al.*, 1999; Rees *et al.*, 2012; Sanderson, 2005). Pelbagai pendekatan kawalan telah diaplikasikan, termasuk penggunaan racun kulat, sanitasi ladang dan agen biokawalan (Mohd Daud *et al.*, 2024). Namun, keberkesanannya didapati tidak konsisten kerana dipengaruhi oleh variasi genetik antara strain *G. boninense*, yang membawa tahap ketahanan berbeza terhadap rawatan (Siddiqui *et al.*, 2021). Kepelbagaian ini dipercayai berkait rapat dengan proses pengawanan seksual yang menghasilkan fasa dwikarion, seterusnya menghasilkan strain dengan tahap kepatogenan yang berbeza-beza (Bharudin *et al.*, 2022; Chan *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2021).

Pengawanan seksual dalam kulat patogen memainkan peranan penting bagi memastikan keupayaannya menjangkiti sel hos. Gen-gen pengawanan berfungsi sebagai faktor kevirulenan utama kerana ia mengawal atur pengekspresan pelbagai gen lain yang terlibat dalam morfogenesis, kevirulenan, serta pertumbuhan dan perkembangan sel. Ketiadaan gen pengawanan yang berfungsi akan menghalang pembentukan struktur khusus akibat dinding sel yang tidak sempurna, sekali gus mengurangkan kevirulenan kulat kerana ketidakupayaannya menembusi dan mencerooboh sel hos. Kekurangan ini turut menjejaskan proses proliferasi dalam sel hos, menyebabkan kulat gagal menginfeksi serta tidak dapat melengkapkan kitaran hidup seksualnya sepertimana yang ditunjukkan oleh *Ustilago maydis* (de Sena-Tomás *et al.*, 2011).

Walaupun hanya fasa dwikarion yang berupaya menginfeksi hos, mekanisme tepat bagaimana proses pengawanan menyumbang kepada variasi keagresifan serta peralihan gaya hidup kulat daripada saprofit kepada patogen masih belum difahami sepenuhnya. Kemunculan data genom dan transkriptom *G. boninense* daripada beberapa strain (Isaac *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2019) telah membuka peluang untuk pencirian gen-gen yang terlibat dalam pertumbuhan, kepatogenan dan pengawanan.

Kajian lalu membuktikan secara molekul mengenai kehadiran dua lokus jenis pengawanan iaitu lokus jenis pengawanan A (lokus matA) dan lokus jenis pengawanan B (lokus matB) yang terlibat dalam sistem pengawanan tetrapolar oleh kulat *G. boninense* (Ab Wahab *et al.*, 2024). Walau bagaimanapun, meskipun sistem pengawanan tetrapolar kulat ini telah berjaya dirungkai melalui analisis keserasian dan ketidakserasian pengawanan serta pengesanan kewujudan dua lokus jenis pengawanan yang tidak terangkai pada peringkat molekul (Ab Wahab *et al.*, 2024), sehingga kini masih belum terdapat sebarang laporan mengenai protein pengangkut feromon (Ste6) yang merupakan salah satu komponen penting dalam sistem pengawanan. Berbeza dengan gen-gen jenis pengawanan yang terletak pada lokus jenis pengawanan, gen *ste6* tidak terletak pada lokus jenis pengawanan (Hsueh and Shen, 2005; Ke *et al.*, 2023).

Bagi meningkatkan lagi pemahaman mengenai sistem pengawanan kulat ini, kajian ini telah dijalankan untuk mengenal pasti protein Ste6 melalui pendekatan bioinformatik dan pemprofilan pengekspresan gen. Penemuan ini dijangka dapat memperkukuh pengetahuan mengenai penglibatan protein ini dalam sistem pengawanan kulat ini serta membuka ruang kepada penerokaan gen tersebut sebagai sasaran berpotensi dalam pembangunan sebatian antikulat pada masa hadapan.

BAHAN DAN KAEDAH

Strain kulat

Sebanyak tiga strain kulat *G. boninense* yang digunakan dalam kajian ini iaitu kulat *G. boninense* Mg12 (monokarion terbitan daripada basidiospora dwikarion *G. boninense* PER71), kulat *G. boninense* Gb1 (monokarion terbitan daripada basidiospora dwikarion *G. boninense* UKM1) dan *G. boninense* Mg12/Gb1 (fasa dwikarion hasil pengawanan di antara *G. boninense* Mg12 dan *G. boninense* Gb1). Kulat-kulat yang digunakan di dalam kajian ini disubkultur di atas agar dekstroza kentang (PDA) secara berkala. Untuk penyimpanan stok kulat jangka masa lama, sebanyak lima plak agar (5 mm × 5 mm) di potong daripada kultur kulat yang berusia 5 hari dan dimasukkan ke dalam tiub 1.5 mL yang steril. Kemudian, sebanyak 700 µL minyak parafin ditambah ke dalam tiub tersebut sebelum kultur stok disimpan pada suhu bilik.

Pencarian dan pengenalan gen *ste6*

Jujukan protein Ste6 (CAA82054.1) daripada *Saccharomyces cerevisiae* telah digunakan sebagai jujukan rujukan untuk mengenal pasti homolog Ste6 dalam *G. boninense* melalui analisis TBLASTN menggunakan pangkalan data genom *G. boninense* G3 dan pangkalan data transkriptom *G. boninense* PER71 (Isaac *et al.*, 2018). Jujukan protein Ste6 yang dikenal pasti kemudiannya diijarkan bersama protein Ste6 daripada spesies kulat lain, iaitu *Schizophyllum commune*, *S. cerevisiae* (CAA82054.1), *Candida albicans* (P53706) dan *Schizosaccharomyces pombe* (P78966). Bagi memperoleh jujukan homolog Ste6 daripada *Ganoderma* sp. 10597 SS1 (JGI ID), *Ganoderma tsugae* S90, *Ganoderma sinense* (PRJNA881499), *Ganoderma multipileum* BCRC 37180 (PRJDA61379), *Ganoderma lucidum* BCRC 37177 (PRJDA61381), analisis TBLASTX dijalankan menggunakan jujukan nukleotida *ste6* daripada *G. boninense* sebagai jujukan rujukan. Jujukan protein yang diramalkan daripada jujukan homolog tersebut kemudiannya digunakan untuk analisis penjajaran bagi mencirikan protein homolog yang dikenal pasti berdasarkan pemuliharaan jujukan asid amino dan domain berfungsi.

Penjajaran jujukan asid amino bagi protein pengangkut feromon Ste6 dilakukan dengan menggunakan perisian ClustalW. Analisis pohon filogeni 'maximum-likelihood' (ML) adalah berdasarkan kepada model evolusi Jones-Taylor-Thornton (JTT) menggunakan perisian Mega 7.0 dengan replikasi 'bootstrap' sebanyak 1000.

Pengawanan Kulat dan Analisis Pengekspresan Gen *ste6* Melalui Kaedah Transkripsi Berbalik Kuantitatif PCR (RT-qPCR)

Asai pengawanan kulat

Kedua-dua kulat monokarion, *G. boninense* Gb1 dan *G. boninense* Mg12 dihidupkan di atas PDA (Pronadisa, Spain) dengan kepekatan agar 2% dan dieram pada suhu 28 °C selama 6 hari. Piring PDA yang digunakan untuk pengsubkulturan kulat Gb1 dilapisi dengan kain keju (*cheesecloth*). Selepas 6 hari eraman, kain keju yang mempunyai kultur kulat monokarion *G. boninense* Gb1 diangkat dan dipindahkan ke dalam piring PDA yang mempunyai kultur kulat monokarion *G. boninense* Mg12 secara bertentangan supaya miselium bagi kedua-dua monokarion boleh bersentuhan untuk mengaruh proses pengawanan. Kaedah ini dikenali sebagai kaedah ko-kultur *sandwich* (Vaillancourt *et al.*, 1997) dengan sedikit modifikasi. Selepas ko-kultur masing-masing selama 2, 4, 6, dan 8 jam, kain keju yang mempunyai kultur kulat monokarion *G. boninense* Gb1 dialihkan sebelum miselium kulat *G. boninense* Mg12 dituai dengan berhati-hati. Sampel kulat monokarion *G. boninense* Mg12 yang tidak didedahkan kepada kulat monokarion *G. boninense* Gb1 digunakan sebagai sampel kawalan. Kesemua sampel disimpan pada suhu -80 °C sehingga digunakan untuk pemencilan RNA jumlah. Asai ini dilakukan dalam tiga replikat biologi bagi setiap parameter. Kaedah asai ko-kultur *sandwich* yang dilakukan bagi analisis pengekspresan gen *ste6* seperti Rajah 1.

Pemencilan RNA jumlah

Pemencilan RNA jumlah dilakukan dengan menggunakan kit pengestrakan RNA iaitu Nucleospin RNA Plant and Fungi (Macharey-Nagel, German) terhadap miselium yang dituai mengikut tempoh asai yang telah ditetapkan. Sebanyak 2 g miselium ditumbuk bersama cecair nitrogen di dalam lesung sehingga menjadi serbuk halus dan dipindahkan ke dalam tiga tiub 1.5 mL yang steril. Pemencilan RNA jumlah dilakukan berdasarkan protocol yang disediakan oleh pengeluar. Bagi langkah terakhir, sebanyak 50 µL larutan air suling bebas RNase ditambah ke dalam tiub pengempas sebelum diempas pada kelajuan 16 363 × g selama 1 min.

Kepekatan RNA jumlah yang diperoleh diukur menggunakan spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific, USA).

Nilai nisbah bacaan penyerapan cahaya $A_{260/280}$ di antara 1.8-2.0 menunjukkan RNA jumlah yang dipencilkan adalah bebas kontaminasi protein manakala nilai nisbah bacaan penyerapan cahaya $A_{260/230}$ di antara 1.8-2.0 menunjukkan sampel RNA jumlah yang dipencilkan adalah bebas daripada kontaminasi karbohidrat (Sambrook & Russell, 2001). Sampel disimpan pada suhu -80 °C sehingga digunakan.

Sintesis bebenang pertama cDNA

Sintesis bebenang pertama cDNA dilakukan dengan menggunakan kit SuperScriptTM IV First-Strand Syntesis System (ThermoFisher Scientific, USA). Sebanyak 5 µg RNA jumlah digunakan dalam analisis ini. Sampel cDNA yang telah berjaya disintesis disimpan pada suhu -20 °C sehingga digunakan. Untuk analisis kuantitatif PCR (qPCR), sebanyak 2 µL stok cDNA dimasukkan ke dalam 23 µL air suling steril sebelum digunakan sebagai templat bagi analisis qPCR.

Analisis pengekspresan gen melalui kaedah RT-qPCR

Nilai kecekapan tindak balas PCR bagi setiap pasangan pencetus spesifik ditentukan terlebih dahulu menggunakan rumus seperti di bawah:

$$\text{Kecekapan PCR} = 10^{-1/\text{kecerunan}} - 1$$

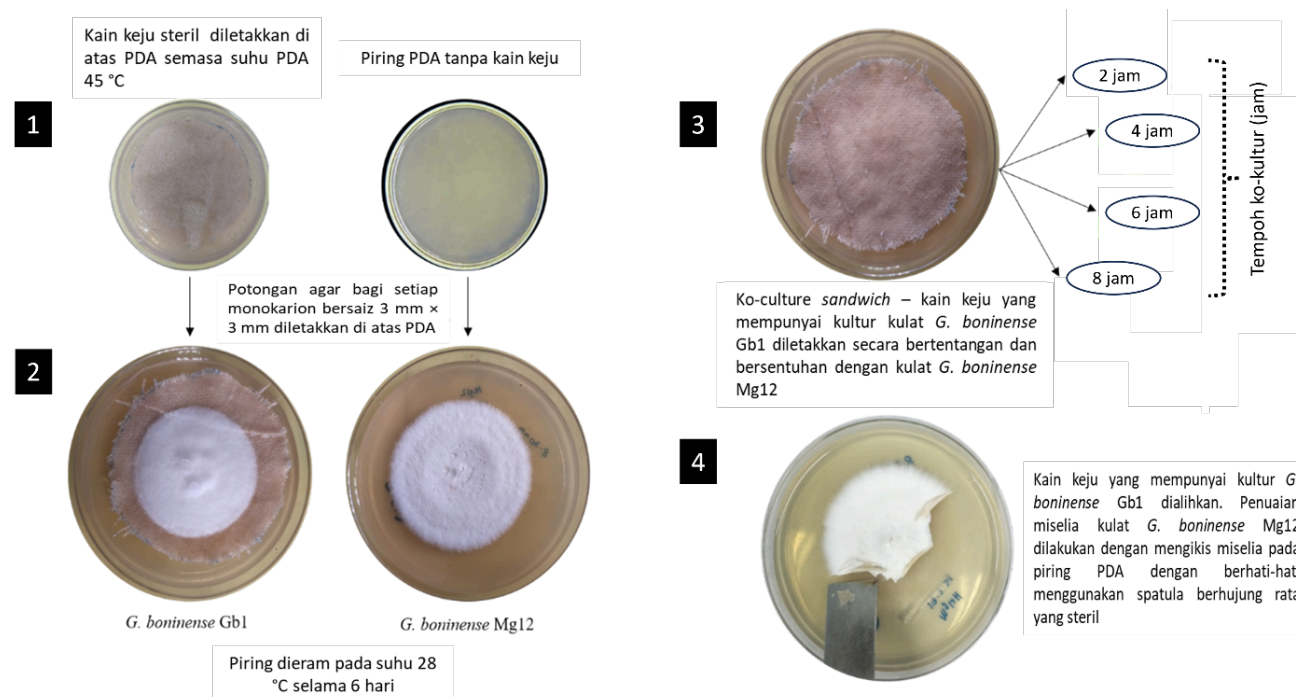
Hanya pasangan pencetus yang menunjukkan kecekapan PCR di antara julat 90% hingga 110% akan diterima dan digunakan dalam analisis qPCR (Bustin *et al.*, 2009). Jujukan pencetus-pencetus yang digunakan di dalam analisis ini adalah seperti Jadual 1.

Analisis statistik

Data kuantitatif dianalisis menggunakan ujian t (*t-test*) bagi menilai perbezaan antara gen-gen yang dikaji. Nilai $p < 0.05$ dianggap menunjukkan perbezaan yang signifikan secara statistik, manakala $p \geq 0.05$ menunjukkan tiada perbezaan yang signifikan secara statistik.

Pencirian gen dan protein pengangkut feromon secara *in silico*

Beberapa analisis bioinformatik telah dilakukan terhadap struktur gen dan protein pengangkut feromon ini untuk mencirikannya secara *in silico*. Antara perisian bioinformatik yang digunakan adalah SignalP 6.0 dan DeepSig untuk mengenalpasti kehadiran jujukan peptida isyarat, ProtScale untuk mengetahui mengenai ciri-ciri fizikokimia berdasarkan kepada jujukan asid amino dan



Rajah 1. Asai pengawanan bagi analisis pengekspresan gen *ste6* melalui kaedah ko-kulture sandwich.

InterPro untuk mengenalpasti kehadiran motif atau domain yang terpulihara. Struktur sekunder protein ditentukan dengan menggunakan perisian HMMTOP v. 2.0 (Tusnady and Simon, 2001) manakala analisis topologi protein dilakukan dengan menggunakan perisian PROTTER (Omasits *et al.*, 2014) dan TOPCONS (Tsirigos *et al.*, 2015).

HASIL KAJIAN

Pengenalpastian dan pencirian gen mengekod protein pengangkut feromon, *ste6*

Pengenalpastian gen mengekod *ste6*

Untuk mengenal pasti kehadiran gen *ste6* dalam data transkriptom *G. boninense*, analisis TBLASTN telah dijalankan dengan menggunakan jujukan gen pengekod *ste6* daripada *S. cerevisiae* (No. Akses: CAA82054.1) sebagai jujukan 'query'. Hasil analisis menunjukkan padanan rendah terhadap empat transkrip yang mewakili dua gen *ste6* putatif, iaitu 23.48% persamaan identiti dengan transkrip comp17255_c0_seq1/comp17505_c0_seq1 (selepas ini dirujuk sebagai transkrip 17255) dan 23.91% persamaan identiti dengan comp23767_c0_seq3/comp23958_c0_seq1 (selepas ini dirujuk sebagai transkrip 23958). Peratusan persamaan identiti bagi kedua-dua gen *ste6* putatif ini selepas dilakukan analisis BLASTP terhadap pangkalan data NCBI adalah seperti Jadual 2. Berdasarkan kepada analisis ini menggunakan jujukan asid amino yang masing-masing ditranslasikan daripada transkrip 17255 dan transkrip 23958, di dapati bahawa transkrip 17255 adalah lebih menyerupai protein Ste6 (*ste6-like protein*) manakala transkrip 23958 pula menunjukkan padanan dengan gen *ste6* daripada *Cryptococcus neoformans* (AAT91069.1) (Hsueh and Shen, 2005). Oleh itu, transkrip 17255 kini dikenali sebagai gen *ste6-like* putatif manakala transkrip 23958 pula kini dikenali sebagai gen *ste6* putatif. Protein Ste6 kebiasaannya menunjukkan jujukan homologi yang tinggi dengan protein pelbagai kerintangan dadah (*Multi-Drug Resistant*, MDR) kerana kedua-dua protein ini tergolong dalam subfamili ABC-B yang sama. Protein Ste6 dilaporkan menunjukkan struktur protein yang lebih terpulihara berbanding dengan jujukan DNA di antara spesies (Raymond *et al.*, 1998). Kajian filogenetik

lanjut terhadap protein ABC terhadap kulat basidiomiset pula menyatakan protein Ste6 dikelaskan di dalam subfamili ABC-B1 (Kovalchuk *et al.*, 2013).

Analisis pohon filogeni ML dengan replikasi 'bootstrap' sebanyak 1000 kali telah dilakukan terhadap protein Ste6 putatif ini (menggunakan jujukan asid amino) dengan protein-protein rujukan menunjukkan bahawa transkrip gen 17255 terkelompok bersama protein-protein yang menyerupai Ste6 dan protein MDR manakala transkrip gen 23958 pula di dapati terkelompok bersama protein-protein Ste6 yang telah dikaji dan dicirikan oleh kajian sebelum ini (Rajah 2).

Analisis tindak balas berantai polimerase kuantitatif masa sebenar (RT-qPCR) bagi gen mengekod *ste6* dan gen mengekod *ste6-like* putatif

A. Pemencilan RNA jumlah

Kaedah RT-qPCR merupakan kaedah yang digunakan secara meluas dalam kajian pengekspresan gen. Untuk kajian ini, kaedah kuatifikasi relatif telah digunakan untuk membandingkan kadar pengekspresan gen *ste6* dan gen *ste6-like* putatif yang telah dikenalpasti berdasarkan data transkriptom *G. boninense* PER71. Pengekstrakan RNA jumlah daripada miselium monokarion *G. boninense* Mg12 yang telah dituai daripada asai ko-kultur *sandwich* mengikut tempoh ko-kultur yang telah ditetapkan iaitu 0 jam (kawalan negatif), 2 jam, 4 jam, 6 jam dan 8 jam telah dilakukan untuk digunakan di dalam analisis pemprofilan pengekspresan gen sasaran.

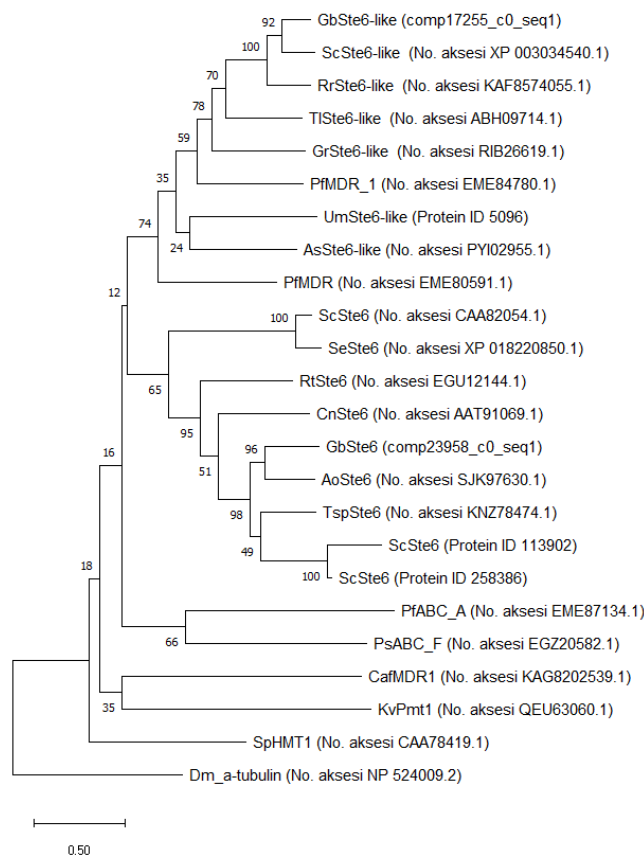
Bacaan kepekatan dan ketulenan RNA jumlah bagi setiap sampel adalah seperti Jadual 3. Berdasarkan bacaan ketumpatan optik pada jarak gelombang 280 nm ($A_{260/280}$) dan 260 nm ($A_{260/230}$), di dapati bahawa kesemua sampel RNA jumlah yang telah dipencilkan adalah tulen dan bebas kontaminasi daripada karbohidrat dan protein dengan bacaan nisbah $A_{260/280}$ dan $A_{260/230}$ bagi semua sampel masing-masing melebihi 1.8 dan 2.0. Sebanyak 2 µg RNA jumlah bagi setiap sampel yang telah dipencilkan dianalisis dengan menggunakan gel agarosa 1% bagi menentukan integriti RNA.

Jadual 1. Maklumat pencetus-pencetus yang digunakan dalam analisis qPCR dalam kajian ini.

Gen	Nama Pencetus	Jujukan pencetus (5'-3')	Suhu penyepuhan (°C)	Catatan
α -tubulin	F- α tub / R- α tub	GTACGTTCCCCGCTCCCTTT / TCCATAACGGGGTCAATCAACTC	59	Pencetus hadapan dan kebelakang bagi gen penyenggara α -tubulin
β -tubulin	F- β tub / R- β tub	AAGTATGTCCCGCGAAGCGTACAGAT / TTCACGTTCCAACGGTGGGAAGG	59	Pencetus hadapan dan kebelakang bagi gen penyenggara β -tubulin
17255 (<i>ste6-like</i>)	F-17255 / R-17255	TCATTTGGGTTTACACGGCCGAAG / TTCCCTGCTGAACCAAGTGAGTGT	59	Pencetus hadapan dan kebelakang bagi gen sasaran 17255
23958 (<i>ste6</i>)	F-23958 / R-23958	ATGATCATCCAAACGCTCTCCCAAGG / GTTCCTCTCATGCTTCTGGGCATT	59	Pencetus hadapan dan kebelakang bagi gen sasaran 23958

Jadual 2. Peratusan padanan gen rujukan bagi setiap transkrip gen *ste6* putatif.

ID transkrip	Padanan gen dan no. akses dari pangkalan data NCBI	Peratusan persamaan identiti (%)
comp17255_c0_seq1 / comp17505_c0_seq1	Protein menyerupai Ste6 (Ste6-like) / XP_041205127	63.59 / 63.75
comp23767_c0_seq3 / comp23958_c0_seq1	Protein pengangkut feromon, Ste6 / CCA72632.1 / AAT91069.1	45.32 / 43.30 / 42.01



Rajah 2. Pohon filogeni ML yang dibina dengan 1000 replikasi 'bootstrap' menggunakan perisian Mega 7.0. Analisis ini menunjukkan protein Ste6 putatif terkelompok bersama protein Ste6 daripada organisma lain manakala protein Ste6-like pula terkelompok bersama protein-protein Ste6-like dan MDR. Protein Ste6 yang telah dikaji secara eksperimen adalah daripada *S. cerevisiae* (No. akses CAA82054.1), *S. commune* (Protein ID 113902 dan Protein ID 258386) dan *C. neoformans* (No. akses AAT91069.1). Protein α -tubulin daripada *Drosophila melanogaster* digunakan sebagai protein luar kumpulan.

Rajah 3 menunjukkan kehadiran 3 jalur RNA yang mewakili tiga jenis ribosom iaitu 5S rRNA, 18S rRNA dan 28S rRNA yang utuh, dan membuktikan bahawa kualiti dan integriti RNA jumlah yang dipencilkan adalah baik.

B. Penentuan kecekapan amplifikasi RT-qPCR

Analisis pengekspresan gen dilakukan dengan menggunakan kaedah kuantifikasi relatif RT-qPCR. Kaedah ini digunakan untuk membandingkan kadar pengekspresan gen *ste6* putatif dan gen *ste6-like* putatif bagi setiap sampel yang dituai daripada asai ko-kultur sandwich mengikut sela masa yang telah ditetapkan. Perubahan tahap pengekspresan gen ditentukan dengan membandingkan gen sasaran pada sampel terawat dengan gen sasaran daripada sampel kawalan. Tahap pengekspresan gen sasaran boleh ditentukan berdasarkan kepada nisbah pengekspresan gen sasaran pada

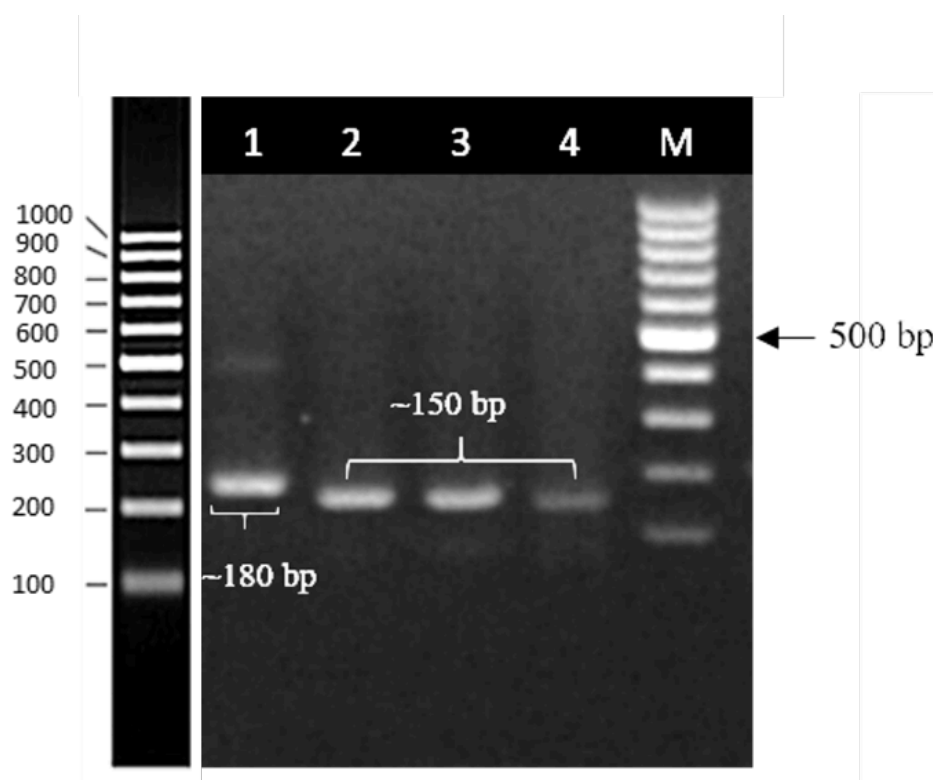
sampel terawat kepada gen sasaran pada sampel kawalan (Schmittgen and Livak, 2008).

Walaupun bagaimanapun, penentuan suhu penyepuhan bagi setiap pencetus untuk setiap gen sasaran harus dilakukan sebelum analisis RT-qPCR dilakukan terhadap gen sasaran bagi memastikan suhu penyepuhan yang digunakan adalah sesuai untuk mengamplifikasikan jujukan gen sasaran dan dapat mengelak pembentukan dimer di antara pasangan pencetus. Gen-gen penyelenggara sel, α -tubulin dan β -tubulin telah digunakan sebagai pernormal terhadap pengiraan tahap pengekspresan gen yang dikaji. Ini kerana pengekspresan gen penyelenggara adalah lebih stabil bagi setiap keadaan.

Dalam kajian ini, kesemua pencetus yang digunakan mempunyai suhu penyepuhan spesifik 59 °C. Berdasarkan analisis gel agarosa

Jadual 3. Kepekatan dan ketulen RNA jumlah yang telah dipencilkan daripada miselium kulat monokarion *G. boninense* Mg12.

Tempoh kultur sandwich (jam)	Kepekatan ($\mu\text{L}/\mu\text{g}$)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
0 (kawalan negatif)	2474	2.21	2.37
2	2267	2.24	2.32
4	2477	2.23	2.43
6	2657	2.25	2.48
8	2561	2.22	2.42



Rajah 3. Profil elektroforesis gel agarosa 2% bagi produk amplifikasi RT-qPCR menggunakan kit komersil Quantinova SYBR Green PCR. Lajur 1: α -tubulin (184 bp); Lajur 2: β -tubulin (160 bp); Lajur 3: *ste6-like*; Lajur 4: *ste6*; Lajur M: Penanda DNA GeneRuler 100 bp (Thermo Scientific, USA).

2%, didapati ketiga-tiga gen yang dikaji (gen mengekod α -tubulin, β -tubulin, *ste6-like* dan *ste6*) menghasilkan produk yang spesifik dengan saiz produk seperti yang telah dianggarkan (Rajah 3). Analisis penjujukan DNA mengesahkan setiap ampikon yang dihasilkan bagi setiap sampel adalah merujuk kepada gen-gen sasaran yang dikaji.

Selain daripada menentukan suhu penyepuhan yang sesuai, analisis kecekapan RT-qPCR juga perlu dilakukan dengan menggunakan lengkuk piawai yang akan memberikan maklumat mengenai kepekaan analisis dan kejituan asai yang dilakukan (Bustin *et al.*, 2009). Berdasarkan hasil yang diperolehi, di dapati semua gen-gen sasaran yang dikaji termasuklah gen penyelenggara sel menunjukkan nilai kecekapan PCR berada dalam julat yang dibenarkan iaitu 105.8%, 102.1%, 90.1% dan 94.2%; masing-masing bagi gen mengekod α -tubulin, β -tubulin, *ste6-like* dan *ste6* dengan nilai $R^2 > 0.99$ (Jadual 4). Nilai kecerunan yang diperolehi bagi setiap pasangan pencetus yang digunakan adalah dalam julat yang boleh diterima iaitu di antara 90% hingga 110% (Bustin *et al.*, 2009). Selain itu, analisis lengkuk peleburan (*melting curve*) juga dilakukan untuk setiap pasangan pencetus bagi memastikan kespesifikan pencetus yang digunakan. Berdasarkan Rajah 4, terdapat hanya satu sahaja puncak tinggi bagi setiap sampel yang diamplifikasikan bagi setiap pasangan pencetus yang digunakan. Ini menunjukkan bahawa setiap pencetus yang digunakan tidak membentuk dimer pencetus dan spesifik terhadap gen sasaran.

C. Profil pengekspresan *ste6-like* dan *ste6*

Kajian ini mendapati bahawa terdapat perbezaan yang signifikan ($P < 0.05$) bagi aras pengekspresan gen *ste6* putatif berbanding gen *ste6-like* putatif semasa asai pengawanan secara ko-kultur *sandwich* dilakukan (Rajah 5). Pengekspresan gen *ste6* putatif meningkat sekurang-kurangnya 4 kali ganda berbanding kawalan selepas 6 jam asai dilakukan dan menurun hampir ke aras basal selepas itu. Pengekspresan gen mengekod *ste6-like* putatif pula dilihat lebih rendah daripada kawalan dan menurun sebaik sahaja miselium

kulat monokarion Mg12 didedahkan kepada miselium kulat monokarion Gb1. Analisis *in-silico* yang seterusnya dalam kajian ini hanya akan dilakukan terhadap gen dan protein pengangkut feromon sebenar sahaja.

D. Analisis *in-silico* bagi gen mengekod *ste6*

Protein Ste6 tergolong dalam protein superfamili pengangkut yang dikenali sebagai superfamili kaset pengikat-ATP (ATP-Binding Cassette, ABC). Protein dalam keluarga ini mempunyai dua bahagian homolog yang sama. Setiap bahagian mempunyai domain pengikatan nukleotida yang terletak pada bahagian protein mengadap sitosol dan domain rentasan membran (MSD) (Geller *et al.*, 1996). Saiz protein Ste6 dalam kajian ini adalah 1478 asid amino.

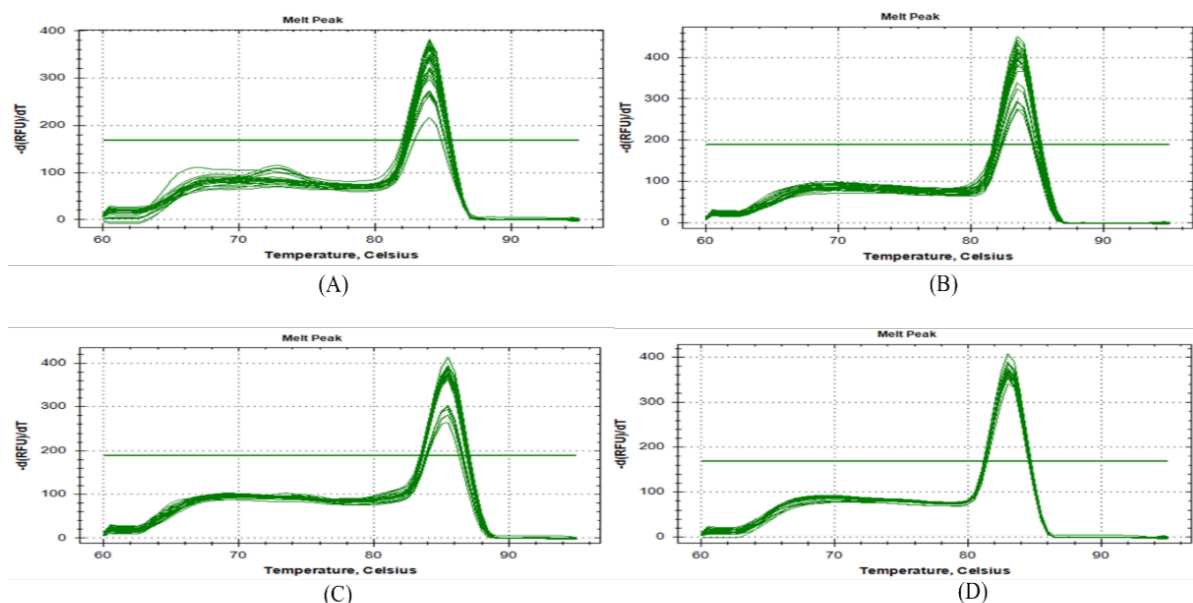
Analisis protein Ste6 menggunakan perisian Phobius dan Protter menunjukkan bahawa protein ini mempunyai 12 domain transmembran (Rajah 6). Setiap bahagian MSD protein Ste6 mempunyai 6 domain transmembran. Protein Ste6 ini juga diramalkan mempunyai 5 tapak untuk glikosilasi-N, iaitu penambahan kumpulan karbohidrat (oligosakarida) yang terdiri daripada beberapa molekul gula pada atom nitrogen yang terdapat pada residu asparagin. Proses modifikasi protein ini adalah penting untuk pembentukan struktur protein yang berfungsi.

Bagi analisis penjajaran, beberapa protein Ste6 rujukan iaitu daripada *S. cerevisiae* (CAA82054.1), *C. albicans* (P53706), *S. commune* (ID Protein 113902 dan 258386) dan *C. neoformans* (AAT91069.1) telah digunakan bagi mengenalpasti jujukan dan motif yang terpulihara. Pengenalpastian kehadiran motif dilakukan dengan menggunakan perisian ScanProsite. Motif-motif seperti 'Walker A (GxxxxGJT/S)', 'Walker B' (hhhhDE; h merujuk kepada asid amino hidrofobik) dan jujukan 'signature' bagi protein Ste6 adalah seperti yang telah dilabelkan (Rajah 7). Motif 'Walker A' dan 'Walker B' merupakan tapak berlakunya pengikatan dan hidrolisis ATP (Ouyang and Zhou, 2017). Protein Ste6 merupakan protein pengangkut aktif, iaitu protein yang memerlukan penggunaan

tenaga kimia daripada proses hidrolisis ATP kepada ADP, oleh itu kehadiran motif 'Walker A' dan 'Walker B' yang juga dikenali sebagai domain pengikatan nukleotida (NBD) pada protein ini adalah dijangkakan. Analisis mutasi terhadap motif 'Walker A' dan 'Walker B' pada protein Rrp2 (protein 'enhancer'

terhadap pengikatan protein pada bakteria *Borrelia burgdorferi*) menyebabkan protein tersebut kehilangan fungsinya. Rajah 8 menunjukkan struktur ramalan bagi protein Ste6 dalam kajian ini.

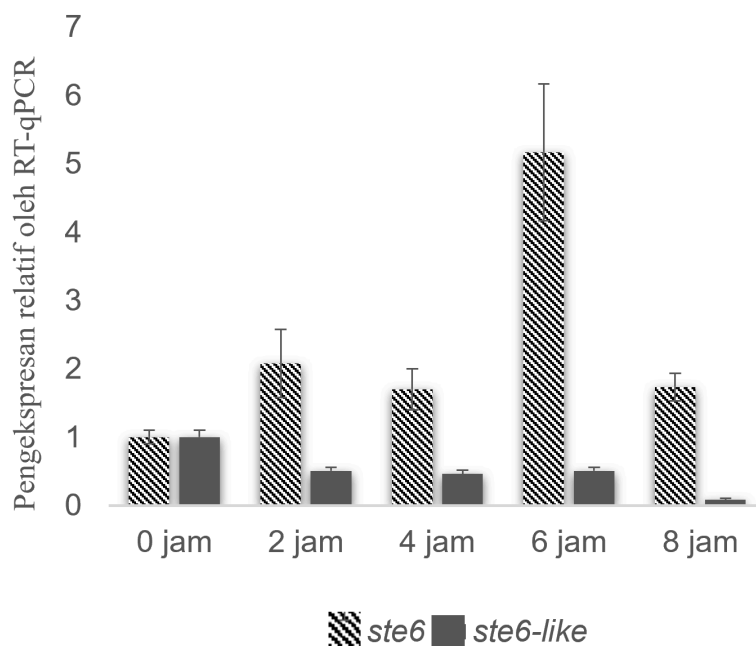
Analisis penjajaran di antara protein-protein Ste6 daripada *Ganoderma* sp. pula menunjukkan bahawa protein pengangkut



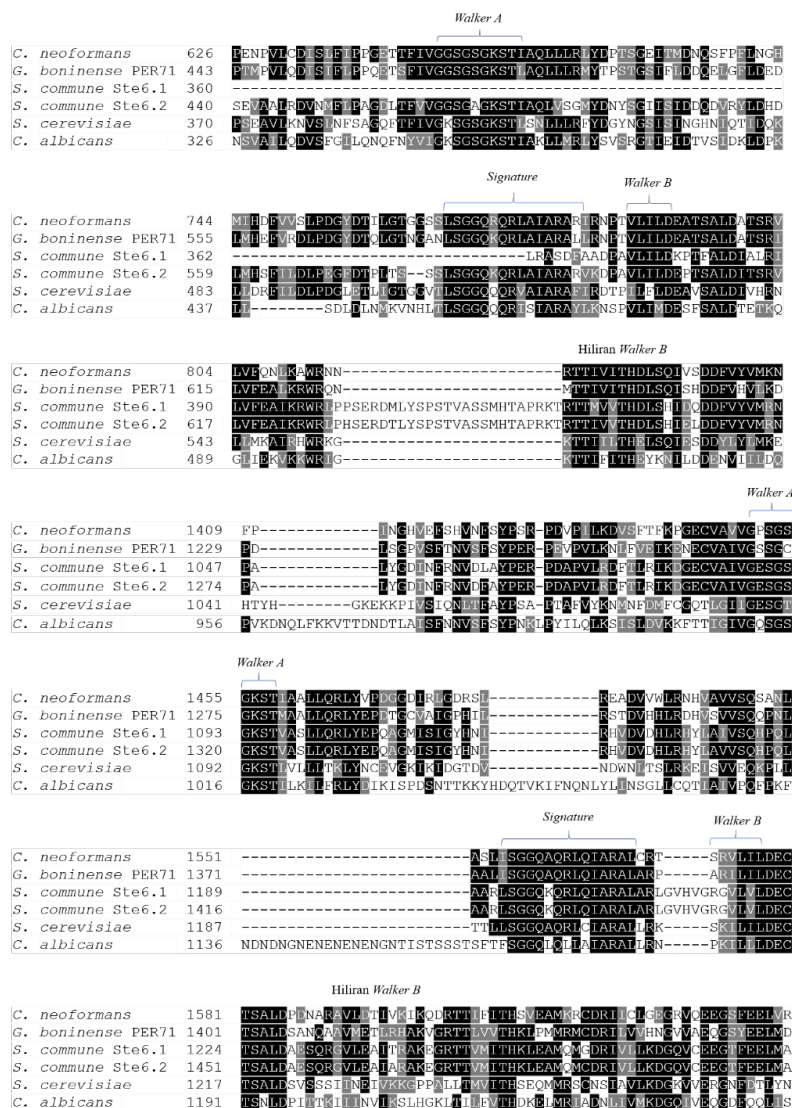
Rajah 4. Lengkuh peleburan bagi setiap gen yang dikaji. A. α -tubulin; B. β -tubulin, C. *ste6-like*; D. *ste6*.

Jadual 4. Kecerunan lengkuh piawai, kecekapan PCR dan nilai R^2 bagi setiap gen yang dikaji.

Gen	Kecerunan lengkuh piawai	Kecekapan PCR (%)	R^2
α -tubulin	-3.1894	105.8	0.9983
β -tubulin	-3.2713	102.1	0.9993
<i>ste6-like</i>	-3.5832	90.1	0.9982
<i>ste6</i>	-3.4675	94.2	0.9975



Rajah 5. Analisis pengekspresan relatif gen *ste6* dan gen *ste6-like* pada sela masa ko-kutur sandwich yang berbeza bagi kulat monokarion *Mg12*.

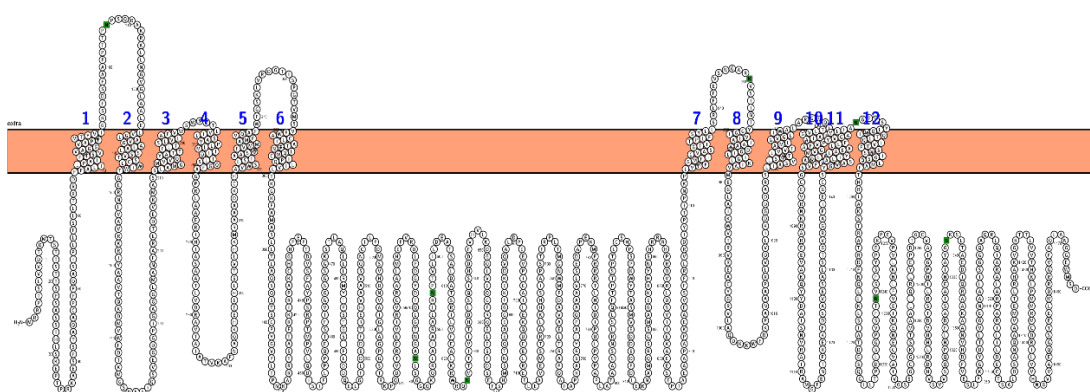


Rajah 7. Analisis penjarangan jujukan asid amino bagi protein Ste6. Kehadiran jujukan dan motif terpuhara adalah seperti yang telah dilabelkan. *Signature*: jujukan 'signature' bagi keluarga pengangkut ABC-B1.

feromon ini adalah terpuhara bagi genus ini (Rajah 9). Analisis penjarangan ini juga telah berjaya mengenal pasti beberapa kawasan protein yang unik dan khusus kepada *G. boninense* sahaja seperti mana yang ditanda pada Rajah 9. Peratusan identiti protein Ste6 dalam kajian ini dengan jujukan rujukan adalah seperti Jadual 5.

PERBINCANGAN

Kulat *G. boninense* ialah kulat pereput putih yang bersifat hemibiotrof. Kulat ini merupakan kulat penyebab utama penyakit BSR pada pokok kelapa sawit. Pada peringkat awal jangkitan, ia bertindak secara biotrof dengan mengambil nutrien daripada akar tanpa menimbulkan kerosakan ketara, menyebabkan pokok kelapa



Rajah 6. Topologi protein Ste6 yang menunjukkan kehadiran 12 domain transmembran. Residu asid amino yang berwarna hijau merujuk kepada tapak bagi glikosilasi-N.

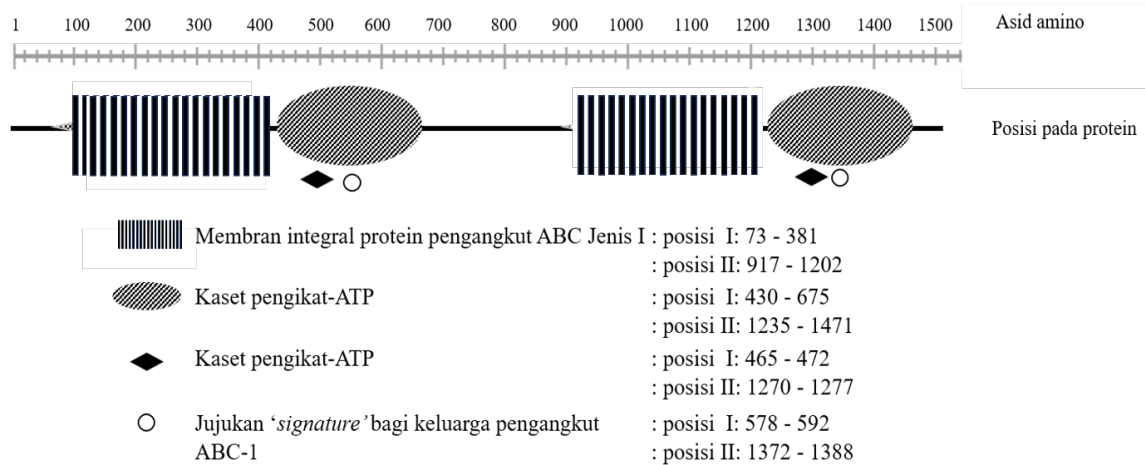
sawit biasanya tidak menunjukkan simptom. Apabila beralih ke fasa nekrotrof yang lebih agresif, kulat mula memusnahkan tisu hos, mengakibatkan kematian sel yang ketara serta kemunculan simptom luaran seperti daun menguning, pengurangan hasil tandan segar, dan akhirnya pereputan pangkal batang yang boleh menyebabkan pokok tumbang (Bahari *et al.*, 2018; Faizah *et al.*, 2022).

Kajian lalu mendapati hanya fasa dwikarion yang berupaya menginfeksi sel perumah, manakala fasa monokarion bersifat saprofit dengan memperoleh nutrien daripada bahan organik yang telah mati (Chan *et al.*, 2011). Kajian metabolom kulat *G. boninense* mendapati bahawa fasa dwikarion *G. boninense* menghasilkan julat metabolit sekunder yang lebih luas berbanding fasa monokarion (Santiago *et al.*, 2023). Metabolit ini merangkumi sebatian yang berkaitan dengan kevirulenan dan kepatogenan, termasuk metabolit daripada tapak jalan sisteina, metionina, arginina, prolina dan fenilalanina yang terlibat dalam penghasilan toksin, pengimbang redoks, ketahanan terhadap tekanan dan struktur infeksi yang diperlukan semasa proses patogenesis (Molina and Kahmann, 2007; Yi *et al.*, 2024). Sebaliknya, fasa monokarion

lebih cenderung menghasilkan metabolit yang menyokong pertumbuhan asas sahaja, dan bukannya metabolit yang terlibat dalam mekanisme jangkitan. Hal ini menunjukkan bahawa proses pengawanan kulat amat penting untuk mengaktifkan laluan metabolik tertentu yang diperlukan bagi menginfeksi sel perumah.

Selain itu, kajian proteomik terhadap *G. lucidum* mendapati bahawa fasa dwikarion memperlihatkan pertumbuhan yang lebih giat dengan peningkatan ekspresi protein yang terlibat dalam biosintesis, pemprosesan RNA, struktur sel, serta pembahagian sel. Proteom yang diprogram semula ini memberikan fasa dwikarion suatu kelebihan pertumbuhan yang merupakan satu ciri yang berkemungkinan besar meningkatkan keupayaannya untuk menjajah dan menyerang tisu perumah (Yu *et al.*, 2025).

Bagi sesetengah patogen seperti *U. maydis*, pembentukan sel dwikarion amat penting kerana ia mengaktifkan laluan metabolik yang menyokong pembentukan struktur khas seperti apresoria, yang diperlukan untuk menembusi sel perumah (Schirawski *et al.*, 2005). Kajian pada *G. boninense* pula menunjukkan bahawa semasa proses infeksi, miselium dwikarion *G. boninense* membentuk struktur mikrohifa halus menyerupai jarum bagi menembusi



Rajah 8. Struktur protein Ste6 bagi *G. boninense* PER71. Kedudukan dan susunan setiap motif dan kaset adalah seperti yang telah dinyatakan.

Jadual 5. Peratusan identiti jujukan bagi protein Ste6 dalam kajian ini terhadap protein Ste6 daripada kulat lain.

Spesies	Saiz protein (asid amino)	Identiti (%)
<i>G. boninense</i> G3	1474	96.87
<i>G. boninense</i> NJ3	1477	99.05
<i>G. lucidum</i> strain Ling-Jian	1458	91.61
<i>Ganoderma</i> sp. 10597 SS1	1455	91.61
<i>G. multipileum</i> BCRC 37180	1493	91.00
<i>Ganoderma resinaceum</i>	1488	91.87
<i>G. lingzhi</i> GL0102	1481	92.21
<i>Ganoderma sinense</i> ZZ0214-1	1478	95.06
<i>Ganoderma leucocontextum</i> HMGIM-I160015	1480	91.74
<i>C. neoformans</i>	1655	42.63
<i>S. cerevisiae</i>	1209	24.70
<i>S. commune</i> (Ste6.1)	1309	35.45
<i>S. commune</i> (Ste6.2)	1527	49.26
<i>C. albicans</i>	1263	21.45

sel akar kelapa sawit. Tidak seperti miselium monokarion, miselium dwikarion mempunyai keupayaan morfologi yang lebih fleksibel untuk membentuk struktur jarum halus ini, sekali gus memudahkan penembusan ke dalam tisu akar dan seterusnya menyebabkan penyakit BSR pada kelapa sawit (Govender and Wong, 2017). Ini menguatkan lagi kenyataan bahawa proses pengawanan kulat untuk menghasilkan fasa dwikarion dalam kulat patogen adalah penting bagi membolehkan kolonisasi hos dan perkembangan penyakit.

Sistem pengawanan *G. boninense* telah dikenal pasti sebagai tetrapolar, berdasarkan kajian pengawanan dan analisis molekul (Ab Wahab *et al.*, 2024). Dalam sistem pengawanan ini, keserasian antara monokarion daripada jasad buah yang sama hanyalah sekitar 25%, manakala daripada jasad buah berbeza boleh mencapai 100%, justeru meningkatkan kebarangkalian pelakuran dan kepelbagaian kumpulan ketidakserasian somatik dalam ladang (Kothe, 1996; Maia *et al.*, 2015).

Bagi kulat basidiomiset, semua feromon pengawanan yang dirembeskan tergolong dalam jenis-a, yang dicirikan oleh motif MD_A_FF (A = asid amino alifatik) pada hujung terminal-N dan

motif CAAX (C = sisteina; A = asid amino alifatik; X = sebarang asid amino) pada hujung terminal-C (Kües *et al.* 2015). Motif CAAX ini penting untuk proses farnesilasi (penambahan kumpulan lipid) dan karboksimetilasi, yang meningkatkan sifat hidrofobik feromon serta membolehkannya berlokalisasi pada membran plasma. Tidak seperti peptida biasa, feromon jenis-a tidak mempunyai peptida isyarat pada hujung terminal-N, menyebabkan ia tidak dapat dirembes melalui laluan perembesan klasik (Claus *et al.*, 2019). Sebaliknya, pengeksportan feromon jenis-a ke luar sel bergantung kepada protein pengangkut aktif Ste6, iaitu anggota keluarga ABC yang berfungsi mengeksport feromon selepas pengubahsuaian lipid berlaku (Michaelis & Barrowman, 2012).

Feromon yang dieksport kemudiannya mengikat pada reseptor Ste3 pada pasangan serasi. Interaksi ini mencetuskan laluan isyarat pengawanan, mengaktifkan transkripsi gen *matA* dan *matB* melalui elemen responsif feromon (PRE), dan seterusnya membawa kepada pelakuran sel serta pembentukan miselium dwikarion yang berupaya menginfeksi hos (Ab Wahab *et al.*, 2024; Kaffarnik *et al.*, 2003).

	1	10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80
GbPER71_Ste6	1	MRRPTSLVVDTDMTSTTTSTSPASSTHLSK-EPTRKVESPS-APACPPQASIPLLFSLTRDRFFALILPAIFTSV
GbG3_Ste6	1	MRRPTSLVVDTDMTSTTTSTSPASSTHLSK-EPTRKVESPS-APACPPQASIPLLFSLTRDRFFALILPAIFTSV
GbN3_Ste6	1	MRRPTSLVVDTDMTSTTTSTSPASSTHLSK-EPTRKVESPS-APACPPQASIPLLFSLTRDRFFALILPAIFTSV
Gr_Ste6	1	MRRPTSLVVDTDMTSTTTSTSPASSTHLSK-SATPRKVESPS-APVCPPPQASIPLLFSLTRDRFFALILPAIFTSV
Gl_Ste6	1	MRRPTSLVVDTDMTSTTTSTSPASSTHLSK-SATPRKVESPS-APVCPPPQASIPLLFSLTRDRFFALILPAIFTSV
Gs_Ste6	1	MRRPTSLVVDTDMTSTTTSTSPASSTHLSK-SATPRKVESPS-APVCPPPQASIPLLFSLTRDRFFALILPAIFTSV
Gleu_Ste6	1	MRRPTSLVVDTDMTSTTTSTSPASSTHLSK-SATPRKVESPS-APVCPPPQASIPLLFSLTRDRFFALILPAIFTSV
Gm_Ste6	1	MRRPTSLVVDTDMTSTTTSTSPASSTHLSK-SATPRKVESPS-APVCPPPQASIPLLFSLTRDRFFALILPAIFTSV
	241	250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320
GbPER71_Ste6	222	TTFLTSLVLAFLVWSLSLTVLSAVPLLMIIQTLSQGFAGPRLAAERHIAASAATLVDRAVTAIATVKAFNAKHEEHH
GbG3_Ste6	239	TTFLTSLVLAFLVWSLSLTVLSAVPLLMIIQTLSQGFAGPRLAAERHIAASAATLVDRAVTAIATVKAFNAKHEEHH
GbN3_Ste6	222	TTFLTSLVLAFLVWSLSLTVLSAVPLLMIIQTLSQGFAGPRLAAERHIAASAATLVDRAVTAIATVKAFNAKHEEHH
Gr_Ste6	222	TTFLTSLVLAFLVWSLSLTVLSAVPLLMIIQTLSQGFAGPRLAAERHIAASAATLVDRAVTAIATVKAFNAKHEEHH
Gl_Ste6	223	TTFLTSLVLAFLVWSLSLTVLSAVPLLMIIQTLSQGFAGPRLAAERHIAASAATLVDRAVTAIATVKAFNAKHEEHH
Gs_Ste6	223	TTFLTSLVLAFLVWSLSLTVLSAVPLLMIIQTLSQGFAGPRLAAERHIAASAATLVDRAVTAIATVKAFNAKHEEHH
Gleu_Ste6	222	TTFLTSLVLAFLVWSLSLTVLSAVPLLMIIQTLSQGFAGPRLAAERHIAASAATLVDRAVTAIATVKAFNAKHEEHH
Gm_Ste6	222	TTFLTSLVLAFLVWSLSLTVLSAVPLLMIIQTLSQGFAGPRLAAERHIAASAATLVDRAVTAIATVKAFNAKHEEHH
	721	730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800
GbPER71_Ste6	702	EKQDEELREELEAVEMSTRALKHHSIAPSTFRPLTMGNWMDVAELTRNQPAPAPRASRIAPCAAVLSGADAP-EKKF
GbG3_Ste6	650	EKQDEELREELEAVEMSTRALKHHSIAPSTFRPLTMGNWMDVAELTRNQPAPAPRASRIAPCAAVLSGADAP-EKKF
GbN3_Ste6	702	EKQDEELREELEAVEMSTRALKHHSIAPSTFRPLTMGNWMDVAELTRNQPAPAPRASRIAPCAAVLSGADAP-EKKF
Gr_Ste6	702	EKQDEELREELEAVEMSTRALKHHSIAPSTFRPLTMGNWMDVAELTRNQPAPAPRASRIAPCAAVLSGADAP-EKKF
Gl_Ste6	703	EKQDEELREELEAVEMSTRALKHHSIAPSTFRPLTMGNWMDVAELTRNQPAPAPRASRIAPCAAVLSGADAP-EKKF
Gs_Ste6	703	EKQDEELREELEAVEMSTRALKHHSIAPSTFRPLTMGNWMDVAELTRNQPAPAPRASRIAPCAAVLSGADAP-EKKF
Gleu_Ste6	702	EKQDEELREELEAVEMSTRALKHHSIAPSTFRPLTMGNWMDVAELTRNQPAPAPRASRIAPCAAVLSGADAP-EKKF
Gm_Ste6	702	EKQDEELREELEAVEMSTRALKHHSIAPSTFRPLTMGNWMDVAELTRNQPAPAPRASRIAPCAAVLSGADAP-EKKF
	801	810.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880
GbPER71_Ste6	781	RRRTLHIIDIPDLPPAPLATAASSNRSLQFTPTSPCLSHSPKMTASMVDEDDDFLEKNAMQSGSMAGEKRRHYS
GbG3_Ste6	729	RRRTLHIIDIPDLPPAPLATAASSNRSLQFTPTSPCLSHSPKMTASMVDEDDDFLEKNAMQSGSMAGEKRRHYS
GbN3_Ste6	781	RRRTLHIIDIPDLPPAPLATAASSNRSLQFTPTSPCLSHSPKMTASMVDEDDDFLEKNAMQSGSMAGEKRRHYS
Gr_Ste6	781	RRRTLHIIDIPDLPPAPLATAASSNRSLQFTPTSPCLSHSPKMTASMVDEDDDFLEKNAMQSGSMAGEKRRHYS
Gl_Ste6	782	RRRTLHIIDIPDLPPAPLATAASSNRSLQFTPTSPCLSHSPKMTASMVDEDDDFLEKNAMQSGSMAGEKRRHYS
Gs_Ste6	782	RRRTLHIIDIPDLPPAPLATAASSNRSLQFTPTSPCLSHSPKMTASMVDEDDDFLEKNAMQSGSMAGEKRRHYS
Gleu_Ste6	782	RRRTLHIIDIPDLPPAPLATAASSNRSLQFTPTSPCLSHSPKMTASMVDEDDDFLEKNAMQSGSMAGEKRRHYS
Gm_Ste6	781	RRRTLHIIDIPDLPPAPLATAASSNRSLQFTPTSPCLSHSPKMTASMVDEDDDFLEKNAMQSGSMAGEKRRHYS
	881	890.....900.....910.....920.....930.....940.....950.....960
GbPER71_Ste6	861	RRRRHARDVRLDSVIIIEKAESA-EEVPAAPQAEISFFRLVRDIYPTIPNKPLVLLGMFICVAGSTITPLFSFLLSRL
GbG3_Ste6	809	RRRRHARDVRLDSVIIIEKAESA-EEVPAAPQAEISFFRLVRDIYPTIPNKPLVLLGMFICVAGSTITPLFSFLLSRL
GbN3_Ste6	861	RRRRHARDVRLDSVIIIEKAESA-EEVPAAPQAEISFFRLVRDIYPTIPNKPLVLLGMFICVAGSTITPLFSFLLSRL
Gr_Ste6	861	RRRRHARDVRLDSVIIIEKAESA-EEVPAAPQAEISFFRLVRDIYPTIPNKPLVLLGMFICVAGSTITPLFSFLLSRL
Gl_Ste6	862	RRRRHARDVRLDSVIIIEKAESA-EEVPAAPQAEISFFRLVRDIYPTIPNKPLVLLGMFICVAGSTITPLFSFLLSRL
Gs_Ste6	862	RRRRHARDVRLDSVIIIEKAESA-EEVPAAPQAEISFFRLVRDIYPTIPNKPLVLLGMFICVAGSTITPLFSFLLSRL
Gleu_Ste6	862	RRRRHARDVRLDSVIIIEKAESA-EEVPAAPQAEISFFRLVRDIYPTIPNKPLVLLGMFICVAGSTITPLFSFLLSRL
Gm_Ste6	861	RRRRHARDVRLDSVIIIEKAESA-EEVPAAPQAEISFFRLVRDIYPTIPNKPLVLLGMFICVAGSTITPLFSFLLSRL
	1121	1130.....1140.....1150.....1160.....1170.....1180.....1190.....1200
GbPER71_Ste6	1101	-----AISNVRAIRAMGFNTFREKFDSSAVESALSTGVRGAFIEGCSYGVASALIYLAALLFFYVGAVALIAN
GbG3_Ste6	1049	-----AISNVRAIRAMGFNTFREKFDSSAVESALSTGVRGAFIEGCSYGVASALIYLAALLFFYVGAVALIAN
GbN3_Ste6	1101	-----AISNVRAIRAMGFNTFREKFDSSAVESALSTGVRGAFIEGCSYGVASALIYLAALLFFYVGAVALIAN
Gr_Ste6	1100	-----AISNVRAIRAMGFNTFREKFDSSAVESALSTGVRGAFIEGCSYGVASALIYLAALLFFYVGAVALIAN
Gl_Ste6	1102	-----AISNVRAIRAMGFNTFREKFDSSAVESALSTGVRGAFIEGCSYGVASALIYLAALLFFYVGAVALIAN
Gs_Ste6	1102	-----AISNVRAIRAMGFNTFREKFDSSAVESALSTGVRGAFIEGCSYGVASALIYLAALLFFYVGAVALIAN
Gleu_Ste6	1100	-----AISNVRAIRAMGFNTFREKFDSSAVESALSTGVRGAFIEGCSYGVASALIYLAALLFFYVGAVALIAN
Gm_Ste6	1100	-----AISNVRAIRAMGFNTFREKFDSSAVESALSTGVRGAFIEGCSYGVASALIYLAALLFFYVGAVALIAN

Rajah 9. Penjajaran jujukan protein Ste6 yang telah dikenal pasti daripada pelbagai spesies *Ganoderma*. Jujukan asid amino bagi ketiga-tiga strain kulat *G. boninense* menunjukkan persamaan yang tinggi di antara satu sama lain, berbanding dengan sepsis-spesies lain daripada genus yang sama. Tulisan berwarna merah menunjukkan kawasan yang terpelihara bagi kulat *G. boninense* yang mungkin boleh digunakan dalam pembangunan biopenanda pada masa hadapan. (Nota: Gb: *Ganoderma boninense*, Gr: *Ganoderma resinaceum*, Gl: *Ganoderma lingzhi*, Gs: *Ganoderma sinense*, Gleu: *Ganoderma leucocontextum* dan Gm: *Ganoderma multipileum*).

Dalam kajian ini, terdapat dua gen mengekod protein pengangkut feromon iaitu *ste6-like* dan *ste6* berdasarkan kepada analisis TBLASTX terhadap pangkalan data *G. boninense* G3 dan data transkriptom. Walaubagaimanapun, analisis lanjutan terhadap kedua-dua gen tersebut menggunakan kaedah qPCR menunjukkan bahawa gen *ste6* adalah gen yang mengekod protein pengangkut feromon yang sebenar berdasarkan kepada peningkatan aras pengekspresan sehingga 4 kali ganda berbanding kawalan selepas 6 jam asai pengawanan dilakukan kulat monokarion *G. boninense* Mg12 didedahkan kepada monokarion *G. boninense* Gb1 dalam asai pengawanan. Pengekspresan gen ini menurun hampir ke aras basal selepas melepasi tempoh 6 jam. Pemerhatian yang sama dilaporkan berlaku pada *C. neoformans* yang hanya menunjukkan peningkatan pengekspresan gen mengekod *ste6* paling tinggi apabila *C. neoformans* didedahkan kepada pasangan serasi selepas 6 jam analisis ko-kultur dan kembali ke aras basal selepas itu (Hsueh and Shen, 2005). Penurunan aras pengekspresan gen mengekod *ste6* adalah untuk mengurangkan kepadatan aliran protein pada membran plasma dan untuk mengitar semula protein membran. Dalam *S. cerevisiae*, jangka hayat separuh bagi protein Ste6 ialah 20 minit sahaja sebelum diubikuitinasi dan dicurahkan di dalam vakuol (Kölling and Losko, 1997; Kranz *et al.*, 2001). Terdapat dua gen mengekod *ste6* pada *S. commune* iaitu *ste6.1* (ID protein: 113902) dan *ste6.2* (ID protein: 258386), yang kedua-duanya menunjukkan peningkatan sebanyak 53.4 dan 5.0 kali ganda apabila diaruh oleh gen-gen *matB* semasa pengawanan berbanding kawalan (gen-gen *ste6* yang diekspreskan oleh monokarion yang tidak didedahkan kepada pasangan serasi) (Erdmann *et al.*, 2012).

Bagi *ste6-like* putatif, profil pengekspresan gennya dilihat lebih rendah daripada kawalan dan menurun sebaik sahaja asai pengawanan dilakukan. Pengekspresan gen *ste6-like* putatif adalah paling rendah selepas 8 jam asai pengawanan. Data ini menunjukkan bahawa gen mengekod *ste6-like* mungkin ditindas oleh gen-gen yang diekspreskan semasa proses pengawanan dan data ini juga membuktikan bahawa gen ini tidak terlibat dalam proses pengawanan.

Berdasarkan analisis-analisis yang dijalankan di dalam kajian ini, terdapat hanya satu gen *ste6* yang berfungsi sebagai protein pengangkut feromon pengawanan. Penemuan ini menunjukkan bahawa protein ini berpotensi dijadikan sasaran bagi pembangunan agen antikulat, kerana gangguan terhadap fungsinya boleh menghalang proses pengawanan seksual kulat, sekali gus mengurangkan pembentukan miselium dwikarion yang bersifat patogen dan seterusnya menurunkan insiden penyakit BSR.

Oleh kerana protein ini sangat terpelihara dalam genus *Ganoderma*, pembangunan bahan antikulat yang disasarkan khusus kepada *G. boninense* adalah lebih mencabar, kerana berpotensi memberi kesan sampingan terhadap spesies *Ganoderma* lain yang tidak patogenik. Walau demikian, tahap keterpeliharaan yang tinggi menjadikan protein ini sesuai digunakan sebagai biopenanda untuk pengecaman kulat pada peringkat genus mahupun spesies, bergantung kepada kaedah yang digunakan.

KESIMPULAN

Kesimpulannya, berdasarkan analisis yang telah dilakukan, protein pengangkut feromon, Ste6 bagi kulat *G. boninense* juga telah berjaya dikenal pasti menggunakan data transkriptom *G. boninense* PER71, dicirikan dan disahkan melalui analisis pengekspresan gen. Jujukan asid amino bagi protein Ste6 adalah sangat terpelihara di dalam genus *Ganoderma* dengan peratusan identiti melebihi 90%. Oleh itu, protein Ste6 ini mungkin tidak sesuai untuk dijadikan sebagai sasaran dalam pembangunan sebatian antikulat, tetapi berpotensi tinggi untuk dibangunkan sebagai biopenanda yang boleh digunakan dalam pengenalan spesies dengan lebih cepat

sehingga ke peringkat spesis, sebagai alternatif kepada penjujukan ITS (*internal transcribed spacer*).

PENGHARGAAN

Projek ini dibiayai oleh Universiti Kebangsaan Malaysia (nombor geran GUP-2022-044).

PENYATAAN ETIKA

Tidak berkenaan.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tiada konflik kepentingan.

REFERENCES

- Ab Wahab, A.F.F., Bharudin, I., Vetaryan, S., Abu Bakar, F.D. & Murad, A.M.A. 2024. Identification and characterization of the mating type (MAT) loci that control the sexual mating process of the oil palm pathogenic fungus *Ganoderma boninense*. *Sains Malaysiana*, 53(11): 3573-3591. <https://doi.org/10.17576/jsm-2024-5311-03>
- Bahari, M.N.A., Sakeh, N.M., Abdullah, S.N.A., Ramli, R.R. & Kadhodaie, S. 2018. Transcriptome profiling at early infection of *Elaeis guineensis* by *Ganoderma boninense* provides novel insights on fungal transition from biotrophic to necrotrophic phase. *BMC Plant Biology*, 18(1): 377. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1594-9>
- Bentivoglio, D., Finco, A. & Bucci, G. 2018. Factors affecting the Indonesian palm oil market in food and fuel industry: Evidence from a time series analysis. *International Journal of Energy Economics and Policy*, 8(5): 49-57.
- Bharudin, I., Ab Wahab, A.F., Abd Samad, M.A., Xin Yie, N., Zairun, M.A., Abu Bakar, F.D. & Abdul Murad, A.M. 2022. Review update on the life cycle, plant-microbe interaction, genomics, detection and control strategies of the oil palm pathogen *Ganoderma boninense*. *Biology*, 11(2): 251. <https://doi.org/10.3390/biology11020251>
- Bridge, P.D., Singh, T. & Arora, D.K. 2003. The application of molecular markers in the epidemiology of plant pathogenic fungi. In: *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. 1st Ed. Arora, D.K. (Ed.). CRC Press, Boca Raton. pp. 57-68. <https://doi.org/10.1201/9780203913369.ch5>
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. & Wittwer, C.T. 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4): 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Chan, J.J., Latiffah, Z., Liew, K.W. & Idris, A.S. 2011. Pathogenicity of monokaryotic and dikaryotic mycelia of *Ganoderma boninense* on oil palm seedlings and germinated seeds in Malaysia. *Australasian Plant Pathology*, 40(3): 222-227. <https://doi.org/10.1007/s13313-011-0031-4>
- Chong, K.P., Dayou, J. & Alexander, A. 2017. Detection and Control of *Ganoderma boninense* in Oil Palm Crop. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54969-9>
- Claus, S., Jezierska, S. & Van Bogaert, I.N.A. 2019. Protein-facilitated transport of hydrophobic molecules across the yeast plasma membrane. *FEBS Letters*, 593(13): 1508-1527. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13469>
- de Sena-Tomás, C., Fernández-Álvarez, A., Holloman, W.K. & Pérez-Martín, J. 2011. The DNA damage response signaling cascade regulates proliferation of the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* in planta. *The Plant Cell*, 23(3): 1654-1665. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082552>
- Erdmann, S., Freihorst, D., Raudaskoski, M., Schmidt-Heck, W., Jung, E.M., Senftleben, D. & Kothe, E. 2012. Transcriptome and functional analysis of mating in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Eukaryotic Cell*, 11(5): 571-589. <https://doi.org/10.1128/EC.05214-11>
- Faizah, R., Putranto, R.A., Raharti, V.R., Supena, N., Sukma, D., Budiani, A., Wening, S. & Sudarsono, S. 2022. Defense response changes in roots of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings after infection by *Ganoderma boninense*. *BMC Plant Biology*, 22(1): 268. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03493-0>
- Geller, D., Taglicht, D., Edgar, R., Tam, A., Pines, O., Michaelis, S. & Bibi, E. 1996. Comparative topology studies in *Saccharomyces cerevisiae* and in *Escherichia coli*: The N-terminal half of the yeast ABC protein Ste6. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23): 13746-13753. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13746>
- Goverder, N. & Wong, M.Y. 2017. Detection of oil palm root penetration by Agrobacterium-mediated transformed *Ganoderma boninense*, expressing green fluorescent protein. *Phytopathology*, 107(4): 483-490. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-16-0062-R>
- Grinn-Gofroñ, A. & Strzelczak, A. 2011. The effects of meteorological factors on the occurrence of *Ganoderma* sp. spores in the air. *International Journal of Biometeorology*, 55(2): 235-241. <https://doi.org/10.1007/s00484-010-0329-x>
- Hsueh, Y.P. & Shen, W.C. 2005. A homolog of Ste6, the a-factor transporter in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for mating but not for monokaryotic fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 4(1): 147-155. <https://doi.org/10.1128/EC.4.1.147-155.2005>

- Hushiarian, R., Yusof, N.A. & Dutse, S.W. 2013. Detection and control of *Ganoderma boninense*: strategies and perspectives. SpringerPlus, 2: 555. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-555>
- Isaac, I.L., Walter, A.W.C.Y., Bakar, M.F.A., Idris, A.S., Bakar, F.D.A., Bharudin, I. & Murad, A.M.A. 2018. Transcriptome datasets of oil palm pathogen *Ganoderma boninense*. Data in Brief, 17: 1108-1111. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.02.027>
- Kaffarnik, F., Müller, P., Leibundgut, M., Kahmann, R. & Feldbrügge, M. 2003. PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. The EMBO Journal, 22(21): 5817-5826. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg554>
- Ke, Y.H., Branco, S., Bazzicalupo, A.L., Nguyen, N.H., Liao, H.L., Kennedy, P., Bruns, T.D., Kuo, A., LaButti, K., Barry, K., Grigoriev, I. & Vilgalys, R. 2023. Genomic determination of breeding system and mating type in *Rhizopogon*. Genetics, 224(3): iyad069. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad069>
- Kölling, R. & Losko, S. 1997. The linker region of the ABC-transporter Ste6 mediates ubiquitination and fast turnover of the protein. The EMBO Journal, 16(9): 2251-2261. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2251>
- Kothe, E. 1996. Tetrapolar fungal mating types: Sexes by the thousands. FEMS Microbiology Reviews, 18(1): 65-87. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00227.x>
- Kovalchuk, A., Lee, Y.H. & Asiegbu, F.O. 2013. Diversity and evolution of ABC proteins in basidiomycetes. Mycologia, 105(6): 1456-1470. <https://doi.org/10.3852/13-001>
- Kranz, A., Kinner, A. & Kölling, R. 2001. A family of small coiled-coil-forming proteins functioning at the late endosome in yeast. Molecular Biology of the Cell, 12(3): 711-723. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.3.711>
- Kües, U., Nelson, D.R., Liu, C., Yu, G.J., Zhang, J., Li, J., Wang, X.C. & Sun, H. 2015. Genome analysis of medicinal *Ganoderma* spp. with plant-pathogenic and saprotrophic life-styles. Phytochemistry, 114: 18-37. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.11.019>
- Maia, T.M., Lopes, S.T., Almeida, J.M.G.C.F., Rosa, L.H., Sampaio, J.P., Gonçalves, P. & Coelho, M.A. 2015. Evolution of mating systems in basidiomycetes and the genetic architecture underlying mating-type determination in the yeast *Leucosporidium scottii*. Genetics, 201(1): 75-89. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.177717>
- Maluin, F.N., Hussein, M.Z. & Idris, A.S. 2020. An overview of the oil palm industry: Challenges and some emerging opportunities for nanotechnology development. Agronomy, 10(9): 1368. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030356>
- Michaelis, S. & Barrowman, J. 2012. Biogenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone a-factor, from yeast mating to human disease. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 76(3): 626-651. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00010-12>
- Midot, F., Lau, S.Y.L., Wong, W.C., Tung, H.J., Yap, M.L., Lo, M.L., Jee, M.S., Dom, S.P. & Melling, L. 2019. Genetic diversity and demographic history of *Ganoderma boninense* in oil palm plantations of Sarawak, Malaysia inferred from ITS regions. Microorganisms, 7(10): 464. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100464>
- Miller, R., Holderness, M., Bridge, P., Chung, G. & Zakaria, M. 1999. Genetic diversity of *Ganoderma* in oil palm plantings. Plant Pathology, 48(5): 595-603. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00390.x>
- Mohd Daud, K.H., Bakar, M.F.A., Bharudin, I., Kamaruddin, S., Quay, D.H.X., Bakar, F.D.A. & Murad, A.M.A. 2024. Identification and functional analysis of Glt3 G protein-coupled receptors in *Ganoderma boninense*. Malaysian Applied Biology, 53(4). <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v53i4.3126>
- Molina, L. & Kahmann, R. 2007. An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. The Plant Cell, 19(7): 2293-2309. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052332>
- Omasits, U., Ahrens, C.H., Müller, S. & Wollscheid, B. 2014. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. Bioinformatics, 30(6): 884-886. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt607>
- Ouyang, Z. & Zhou, J. 2017. The putative Walker A and Walker B motifs of Rrp2 are required for the growth of *Borrelia burgdorferi*. Molecular Microbiology, 103(1): 86-98. <https://doi.org/10.1111/mmi.13545>
- Paterson, R.R.M. 2019. *Ganoderma boninense* disease of oil palm to significantly reduce production after 2050 in Sumatra if projected climate change occurs. Microorganisms, 7(1): 24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010024>
- Raymond, M., Dignard, D., Alarco, A.M., Mainville, N., Magee, B.B. & Thomas, D.Y. 1998. A Ste6p/P-glycoprotein homologue from the asexual yeast *Candida albicans* transports the a-factor mating pheromone in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular Microbiology, 27(3): 587-598. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00704.x>
- Rebitanim, N.A., Hanafi, M.M., Idris, A.S., Abdullah, S.N.A., Mohidin, H. & Rebitanim, N.Z. 2020. GanoCare® improves oil palm growth and resistance against *Ganoderma* basal stem rot disease in nursery and field trials. BioMed Research International, 2020: 3063710. <https://doi.org/10.1155/2020/3063710>
- Rees, R.W., Flood, J., Hasan, Y., Potter, U. & Cooper, R.M. 2009. Basal stem rot of oil palm (*Elaeis guineensis*); mode of root infection and lower stem invasion by *Ganoderma boninense*. Plant Pathology, 58(5): 982-989. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02100.x>
- Rees, R.W., Flood, J., Hasan, Y., Wills, M.A. & Cooper, R.M. 2012. *Ganoderma boninense* basidiospores in oil palm plantations: evaluation of their possible role in stem rots of *Elaeis guineensis*. Plant Pathology, 61(3): 567-578. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02533.x>
- Sambrook, J. & Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanderson, F.R. 2005. An insight into spore dispersal of *Ganoderma boninense* on oil palm. Mycopathologia, 159(1): 139-141. <https://doi.org/10.1007/s11046-004-4436-2>
- Santiago, K.A.A., Wong, W.C., Goh, Y.K., Tey, S.H. & Ting, A.S.Y. 2023. Metabolomics approach in identifying biomarkers from pathogenic *Ganoderma boninense* involved in early interactions with oil palm roots. Physiological and Molecular Plant Pathology, 128: 101980. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.101980>
- Schirawski, J., Böhnert, H.U., Steinberg, G., Snetselaar, K., Adamikowa, L. & Kahmann, R. 2005. Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. The Plant Cell, 17(12): 3532-3543. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.036285>
- Schmittgen, T.D. & Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. Nature Protocols, 3(6): 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Siddiqui, Y., Surendran, A., Paterson, R.R.M., Ali, A. & Ahmad, K. 2021. Current strategies and perspectives in detection and control of basal stem rot of oil palm. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(5): 2840-2849. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.016>
- Tsirigos, K.D., Peters, C., Shu, N., Käll, L. & Elofsson, A. 2015. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. Nucleic Acids Research, 43(W1): W401-W407. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv485>
- Tusnady, G.E. & Simon, I. 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. Bioinformatics, 17(9): 849-850. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.9.849>
- Vaillancourt, L.J., Raudaskoski, M., Specht, C.A. & Raper, C.A. 1997. Multiple genes encoding pheromones and a pheromone receptor define the Bβ1 mating-type specificity in *Schizophyllum commune*. Genetics, 146(2): 541-551. <https://doi.org/10.1093/genetics/146.2.541>
- Wong, M.Y., Govender, N.T. & Ong, C.S. 2019. RNA-seq data of *Ganoderma boninense* at axenic culture condition and under in planta pathogen-oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) interaction. BMC Research Notes, 12(1): 315. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4652-y>
- Wong, W.C., Tung, H.J., Fadhillah, M.N., Midot, F., Lau, S.Y.L., Melling, L., Astari, S., Hadziabdic, D., Trigiano, R.N., Goh, K.J. & Goh, Y.K. 2021. Genetic diversity and gene flow amongst admixed populations of *Ganoderma boninense* in Sarawak, Malaysia. Mycologia, 113(6): 1156-1170. <https://doi.org/10.1080/00275514.2021.1884815>
- Yi, Y., Luan, P., Fan, M., Wu, X., Sun, Z., Shang, Z., Yang, Y. & Li, C. 2024. Antifungal efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* ZK-9 against *Fusarium graminearum* and analysis of the potential mechanism. International Journal of Food Microbiology, 424: 110821. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110821>
- Yu, H., Dong, L. & Zhao, Q. 2025. Proteome study of dikaryotic and monokaryotic mycelia reveals the transfer between biological processes contributing to dikaryon growth advantage of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. BMC Genomics, 26(1): 262. <https://doi.org/10.1186/s12864-025-11905-2>
- Yusoff, A., Ashaari, F.H.M., Abd Samad, M.A., Ab Wahab, A.F.F. & Bharudin, I. 2021. Identification of soil bacteria with antifungal activity towards palm oil pathogen, *Ganoderma boninense*. Sains Malaysiana, 50(12): 3521-3532. <https://doi.org/10.17576/jsm-2021-5012-08>