

Pengenalanpastian dan Pencirian Lokus Jenis Pengawanan (MAT) yang Mengawal Proses Pengawanan Seksual Kulat Patogen Kelapa Sawit *Ganoderma boninense* (Identification and Characterization of the Mating Type (MAT) Loci that Control the Sexual Mating Process of the Oil Palm Pathogenic Fungus *Ganoderma boninense*)

ANIS FARHAN FATIMI AB WAHAB^{1,2}, IZWAN BHARUDIN¹, SHARMILAH VETARYAN², FARAH DIBA ABU BAKAR¹ & ABDUL MUNIR ABDUL MURAD^{1,*}

¹*Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia*

²*FGV R&D Sdn. Bhd., FGV Innovation Centre (Biotechnology), PT. 23417 Lengkuk Teknologi, 71760 Bandar Enstek, Negeri Sembilan, Malaysia*

Diserahkan: 29 April 2024/Diterima: 7 Ogos 2024

ABSTRAK

Ganoderma boninense merupakan kulat patogen utama penyebab penyakit reput pangkal batang (BSR) terhadap tanaman kelapa sawit. Sepanjang kitar hidupnya, kulat ini menghasilkan dua jenis miselium iaitu miselium monokarion dan miselium dwikarion. Walau bagaimanapun, hanya miselium dwikarion (miselium sekunder) sahaja yang berkeupayaan untuk menjangkiti pokok kelapa sawit. Miselium dwikarion terbentuk apabila dua miselium monokarion yang membawa lokus jenis pengawanan berbeza, bertemu, melakur dan seterusnya mengawan untuk membentuk miselium dwikarion. Sehingga kini, masih tiada penelitian dilakukan terhadap gen jenis pengawanan yang terdapat pada lokus jenis pengawanan kulat ini. Oleh itu, objektif kajian ini adalah untuk mengenal pasti gen jenis pengawanan kulat *G. boninense* menggunakan kaedah perlombongan data genom *G. boninense* G3 yang terdapat pada pangkalan NCBI dan mencirikan gen tersebut secara *in-silico*. Berdasarkan analisis yang dilakukan, dua lokus jenis pengawanan, iaitu lokus jenis pengawanan A (matA) yang menempatkan gen mengekod faktor transkripsi homeodomain 1 (*HDI*) dan homeodomain 2 (*HD2*), dan lokus jenis pengawanan B (matB) yang menempatkan lapan gen *ste3* yang mengekod protein reseptor feromon dan lima gen *phr* yang mengekod protein pelopor feromon pengawanan telah berjaya dikenal pasti masing-masing terletak pada LG-2 dan LG-7. Kebanyakan gen jenis pengawanan ini menunjukkan variasi jujukan yang tinggi dengan gen jenis pengawanan daripada *Ganoderma* sp. yang lain. Kesimpulannya, kehadiran dua lokus jenis pengawanan dalam genom *G. boninense* ini telah mengesahkan secara molekul bahawa pengawanan seksual kulat ini dikawal oleh sistem pengawanan jenis tetrakutub.

Kata kunci: *Ganoderma boninense*; lokus jenis pengawanan; penyakit reput pangkal batang

ABSTRACT

Ganoderma boninense is the main causal agent for basal stem rot (BSR) disease in oil palm. During its life cycle, this fungus produces two types of mycelia, known as the monokaryotic and dikaryotic mycelia. However, only dikaryotic mycelia are capable of infecting the living oil palm and causing the BSR disease. Dikaryotic mycelia are formed when two compatible monokaryons successfully mate. However, the mating components and process for this fungus are poorly understood at the molecular level. Hence, the objectives of this study were to identify proteins that may be involved in the mating process via genome mining using the *G. boninense* G3 genome database and to perform *in-silico* characterization on the identified putative mating-type genes. Based on the analysis, two mating-type loci, known as the mating-type A (matA) locus where the homeodomain 1 (*HDI*) and homeodomain 2 (*HD2*) genes reside, and the mating-type B (matB) locus where eight *ste3* and five *phr* genes are located, have been successfully discovered at LG-2 and LG-7, respectively. Even among *Ganoderma* species, the majority of mating-type genes show significant sequence variation. In conclusion, the presence of two mating-type loci in the *G. boninense* G3 genome has molecularly confirmed that this fungus harbors the tetrapolar mating system that governs its sexual reproduction process.

Keywords: Basal stem rot disease; *Ganoderma boninense*; mating-type loci

PENGENALAN

Kelapa sawit merupakan salah satu tanaman pertanian yang penting bagi Malaysia dan Indonesia (Murphy, Goggin & Paterson 2021). Kedua-dua negara ini merupakan negara pengeluar minyak sawit utama dan menyumbang kira-kira 85% daripada penghasilan minyak sawit di seluruh dunia. Kelapa sawit merupakan penghasil minyak sayuran yang sangat baik. Ini kerana kelapa sawit hanya memerlukan 0.26 hektar tanah sahaja untuk menghasilkan 1 tan metrik minyak berbanding minyak sayuran lain seperti bunga kanola (1.5 hektar), bunga matahari (2.0 hektar) dan kacang soya (2.2 hektar) (Bucci, Bentivoglio & Finco 2018). Pengeluaran hasil sawit bagi negara Malaysia menunjukkan peningkatan yang tekal sejak 2007 sehingga mencapai sekitar 2000 juta metrik tan setahun kecuali pada tahun 2017 dan 2018 yang mencatatkan sedikit penurunan hasil minyak sawit kasar (CPO) disebabkan oleh perubahan cuaca dan suhu yang telah mengganggu prestasi penghasilan tandan sawit segar di ladang-ladang sawit (Parveez et al. 2021).

Walau bagaimanapun, tanaman kelapa sawit ini diancam oleh pelbagai jenis penyakit yang boleh mengganggu penghasilan tandan sawit segar. Antara penyakit bagi pokok kelapa sawit yang telah dilaporkan sehingga kini adalah penyakit 'brown germ' yang disebabkan oleh *Aspergillus carneus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* dan *Penicillium* sp. (Pornsuriya et al. 2013), penyakit bintik daun yang disebabkan oleh *Curvularia oryzae*, *Colletotrichum* spp., *Cercospora* spp. dan *Pestalotiopsis* spp. (Nasehi, Sathyapriya & Wong 2020; Pornsuriya et al. 2013), penyakit layu vaskular (*Marchitez disease*) yang disebabkan oleh *Phytophthora* sp. (Defitri 2017) dan penyakit reput pangkal atas (USR) serta penyakit reput pangkal batang (BSR) yang disebabkan oleh kulat *Ganoderma* sp. (Yusoff et al. 2021). Namun begitu, penyakit BSR merupakan penyakit yang paling tinggi dilaporkan menyerang tanaman sawit di Indonesia dan Malaysia (Wong et al. 2021) dan telah menyebabkan kerugian besar yang dianggarkan boleh mencapai USD 365 hingga USD 500 juta setahun (Paterson 2020). Penyakit BSR boleh menyebabkan jangka hayat pokok kelapa sawit menjadi lebih pendek serta mengurangkan 50-80% daripada hasil tandan sawit (bilangan tandan dan berat buah kelapa sawit) (Paterson 2019). Sekiranya jangkitan BSR berlaku semasa pokok kelapa sawit masih muda, iaitu berusia antara 5 tahun sehingga 15 tahun, ia akan menyebabkan kerugian yang lebih tinggi kerana usia tersebut merupakan usia yang paling produktif untuk menghasilkan tandan sawit segar yang baik dan berkualiti. Selain itu, petani juga terpaksa menampung kos kerugian untuk pembelian anak-anak pokok kelapa sawit bagi tujuan penanaman semula yang lebih awal serta kos untuk proses rawatan sanitasi terhadap tanah ladang terlebih dahulu bagi mengelakkan jangkitan BSR ulangan (Hushiarian, Yusof & Dutse 2013).

Kulat patogen utama yang menyebabkan penyakit BSR adalah *Ganoderma boninense*, diikuti oleh *G. zonatum* dan *G. miniatocinctum* (Bharudin et al. 2022). Kulat *G. boninense* merupakan kulat basidiomiset yang bersifat hemibiotrof iaitu membentuk fasa biotrof yang tidak menyebabkan kerosakan tisu hos yang ketara pada peringkat awal jangkitan dan bertukar kepada fasa nekrotrof yang menyebabkan kerosakan pada sel hos dengan lebih ketara apabila diaruh oleh komponen sistem pertahanan hos pada peringkat pertengahan jangkitan (Ab Wahab et al. 2022; Bahari et al. 2018; Chong, Dayou & Alexander 2017). Selain itu, hanya fasa dwikarion kulat ini sahaja yang bersifat invasif dan boleh menyebabkan penyakit pada pokok kelapa sawit manakala fasa monokarionnya adalah bersifat saprofit (Chan et al. 2011; Paterson 2019). Kulat *G. boninense* kebiasaannya akan membentuk jaringan miselium yang tebal pada bahagian akar pokok kelapa sawit sebelum pencerobohan ke dalam sel akar berlaku (Alexander et al. 2017). Berdasarkan kajian yang dilakukan oleh Govender dan Wong (2017), hujung hifa kulat ini akan berubah morfologi untuk membentuk struktur seperti jarum halus bagi membantu proses penetrasi kulat ini ke dalam sel hos. Miselium kulat yang telah berjaya memasuki sel hos akan memenuhi ruang pada tisu vaskular dan menyebabkan gangguan terhadap pengambilan air dan nutrien oleh pokok, seterusnya menyebabkan terbitnya simptom seperti daun pelepah kekuningan dan pucuk baharu yang tidak berkembang. Jangkitan yang serius akan menyebabkan tisu akar dan pangkal batang menjadi reput dan akhirnya tumbang (Kurihara et al. 2022).

Sehingga kini, terdapat banyak kaedah yang telah dibangunkan untuk mengawal dan mengekang penebaran penyakit BSR di kawasan ladang. Sebagai contoh, penggunaan kaedah pensanitasi kawasan ladang seperti penyemburan racun rumpai gliposat untuk meracuni pokok-pokok tua bagi menghalang pembentukan inokulum sekunder sebelum proses penanaman semula dilakukan, penggunaan agen biokawalan seperti *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cepacia* dan *Pseudomonas syringae* untuk mengawal pertumbuhan *G. boninense*, penggunaan racun pewartap seperti dazomet untuk merawat dan memanjangkan jangka hayat pokok kelapa sawit yang telah terjangkit, penggunaan kultivar pokok kelapa sawit yang menunjukkan darjah toleransi yang lebih tinggi terhadap jangkitan kulat ini (Maluin, Hussein & Idris 2020; Ramli et al. 2016; Susanto, Sudharto & Purba 2005). Walau bagaimanapun, kesan bagi setiap pendekatan yang digunakan untuk mengawal dan mengekang pemerebaran kulat ini di kawasan ladang adalah berbeza-beza. Keadaan ini mungkin disebabkan oleh perbezaan strain pencilan kulat yang hadir di setiap kawasan ladang yang memberikan gerak balas yang

berbeza terhadap setiap rawatan yang diberikan. Kajian yang dilakukan oleh Latifah dan Ho (2005) dan Miller et al. (1999) mendapati bahawa semua pencilan kulat *G. boninense* dwikarion yang dipencilkan sama ada daripada kawasan ladang yang sama mahupun berlainan adalah berbeza di antara satu sama lain berdasarkan kepada analisis gerak balas ketidakserasian somatik dan kaedah penanda biomolekul polimorfisme panjang fragmen rawak (RFLP) yang digunakan. Kehadiran strain pencilan yang berbeza ini adalah disebabkan sistem pengawanan tetrakutub yang menggalakkan pengawanan silang berlaku, seterusnya meningkatkan perbezaan kandungan genetik yang dibawa oleh setiap progeni (Bharudin et al. 2022).

Kajian yang dilakukan oleh Pilotti, Sanderson dan Aitken (2002) terhadap interaksi di antara miselium monokarion dan dwikarion telah menunjukkan bahawa kulat *G. boninense* mempunyai sistem pengawanan tetrakutub. Hanya 25% daripada monokarion yang dipencilkan daripada basidiokap yang sama menunjukkan keserasian untuk mengawan. Walau bagaimanapun, sehingga kini, pengenalpastian gen jenis pengawanan secara molekul bagi kulat ini masih belum dilaporkan. Oleh itu, kajian ini dilakukan adalah untuk mengenal pasti gen jenis pengawanan, lokasi lokus jenis pengawanan di dalam genom dan mencirikan gen jenis pengawanan ini secara in-silico. Hasil daripada kajian ini boleh digunakan untuk memahami sistem pengawanan tetrakutub yang kompleks pada kulat ini dengan lebih mendalam seterusnya membolehkan kajian lanjutan terhadap pembangunan kaedah yang lebih berkesan untuk menangani masalah penyakit BSR ini dilakukan pada masa hadapan.

BAHAN DAN KAEDAH

PENGENALPASTIAN LOKUS matA DAN LOKUS matB SERTA GEN YANG MENGEKOD PROTEIN HOMEODOMAIN (HD), PROTEIN RESEPTOR PENGAWANAN (Ste3) DAN PROTEIN PELOPOR FEROMON PENGAWANAN (Phr)

Gen mengekod protein homeodomain I (HD1) dan protein homeodomain 2 (HD2) yang terlibat dalam proses pengawanan tetrakutub dalam kulat basidiomiset biasanya terletak pada lokus jenis pengawanan A (matA) yang diapit oleh gen *mitochondrial intermediate peptidase (mip)* dan β -flanking gene (β -fg) (Kües et al. 2015). Jujukan protein Mip (AB435542.1) dan β -fg (AY462112.1) daripada *Pholiata nameko*, Mip (AY462112.1) daripada *Pholiata djamor* dan β -fg (XP_007313166.1) daripada *Serpula lacrymans* var *lacrymans* telah digunakan sebagai jujukan rujukan (Van Peer et al. 2011) bagi carian gen dalam data genom *G. boninense* G3 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_002900995.3) menerusi analisis tBLASTn. Jujukan protein HD1 dan HD2 daripada *Ganoderma* sp.

strain 10597 SS1, *Ganoderma* sp. strain Xiangnong No. 1, *Ganoderma lucidum* strain BCRC 37177 dan *G. lucidum* strain G.260125-1 seperti yang telah dilaporkan oleh Kües et al. (2015) pula digunakan untuk mengenal pasti kehadiran gen HD1 dan HD2 yang terdapat pada lokus matA tersebut.

Seterusnya, carian jujukan gen mengekod protein reseptor feromon, Ste3 yang terdapat dalam pangkalan data genom *G. boninense* G3 pula turut dilakukan melalui analisis tBLASTn menggunakan jujukan gen ste3 daripada *Ganoderma* sp. seperti yang telah dilaporkan oleh Kües et al. (2015). Pemetaan kedudukan gen ste3 ini dilakukan terhadap pangkalan data genom bagi mendapatkan lokasi lokus matB untuk dicirikan. Bagi mengenal pasti gen mengekod pelopor feromon, Phr, jujukan protein bagi pelopor feromon daripada *Ganoderma* sp. strain 10597 SS1, *Ganoderma* sp. strain Xiangnong No. 1, *G. lucidum* strain BCRC 37177 dan *G. lucidum* strain G.260125-1 seperti yang dilaporkan oleh Kües et al. (2015) telah digunakan sebagai jujukan rujukan. Selain itu, bagi rangka bacaan terbuka yang mempunyai motif pendek MDAFF pada terminal-N dan CAAX pada terminal-C yang berada pada lokus jenis pengawanan juga telah dikenal pasti secara manual dan dikenali sebagai jujukan putatif pelopor feromon. Lokasi yang menempatkan gen ste3 dan phr ini akan dikenali sebagai lokus matB.

ANALISIS POHON FILOGENI PROTEIN JENIS PENGAWANAN

Analisis penjajaran jujukan asid amino dilakukan dengan menggunakan perisian Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), Multi Align Show (http://www.bioinformatics.org/SMS/multi_align.html) dan MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Analisis pohon filogeni 'maximum-likelihood' dilakukan dengan menggunakan perisian MEGAX (Kumar et al. 2018) dengan replikasi butstrap sebanyak 1000. Model evolusi yang digunakan adalah Poisson.

Analisis pohon filogeni telah dilakukan terhadap homolog HD1 dan HD2 yang terletak pada lokus matA serta Ste3 dan Phr yang terletak pada lokus matB menggunakan jujukan asid amino secara berasingan mengikut lokus. Bagi analisis pohon filogeni protein homeodomain (protein HD1 dan HD2), jujukan asid amino bagi protein rujukan yang digunakan adalah seperti yang dilaporkan oleh Kües et al. (2015) bagi spesies *Ganoderma* sp., Aaz4 (ID: 80879), Abq6 (ID: 269864), Abt6 (ID: 269861), Abs6 (ID: 269862), Abu6 (ID: 269858), Abr6 (ID: 104345), Aay4 (ID: 231556) dan Abv6 (ID: 269851) bagi spesies *S. commune* yang diperoleh daripada pangkalan data JGI (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Schco1/Schco1.home.html>), HD1 (XP_001829154.1) dan HD2 (AHX97890.1) bagi spesies *C. cinerea*, HD1 (AOC97458.1) dan HD2 (AGG68692.2) bagi spesies *F. velutipes*, HD1 (EDR15177.1) dan HD2

(ID: 379291) bagi spesies *Laccaria bicolor*, HD1 (B1) (XP_011386823.1) dan HD2 (B2) (P22016.1) bagi spesies *U. maydis* manakala jujukan rujukan yang digunakan untuk analisis filogeni bagi protein reseptor feromon adalah seperti yang dilaporkan oleh Kües et al. (2015) bagi spesies *Ganoderma* sp, Rcb1 (AF186383), Rcb2 (Y11081), Rcb2.42 (AAF01419.1), Rcb3 (Y11080) dan Rcb3.42 (AAF01420.1), Ste3_02153T0 (1852) dan Ste3_02151T0 (1851) bagi spesies *C. cinereus*, FvSte3.1 (HQ630590.1), FvSte3.2 (HQ630591.1), FvSte.s3 (HQ630592), FvSte.s5 (ADX23543.1), FvSte.s1 (HQ630592) dan FvSte3.s4 (HQ630595) daripada *Flammulina velutipes* (Riquelme et al. 2005; Van Peer et al. 2011). Jujukan rujukan Phr yang digunakan sebagai jujukan rujukan bagi analisis pohon filogeni terhadap protein Phr adalah diperoleh daripada Kües et al. (2015). Keterlibatan bagi setiap protein Ste3 rujukan yang digunakan dalam proses pengawanan adalah seperti Jadual 1.

PENCIRIAN GEN HD1, HD2, Ste3 DAN Phr SECARA *in siliko*

Penentuan domain protein bagi protein jenis pengawanan dilakukan dengan menggunakan perisian InterPro dan PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>) (Sigrist et al. 2012). Struktur sekunder protein ditentukan dengan menggunakan perisian HMMTOP v. 2.0 (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>) (Tusnady & Simon 2001) manakala analisis topologi protein dilakukan menggunakan perisian PROTOP (<https://wlab.ethz.ch/protter/start/>) (Omasits et al., 2014) dan TOPCONS (<https://topcons.cbr.su.se/>) (Tsirigos et al. 2015). Perisian WoLF PSORT digunakan untuk menentukan domain penempatan nukleus manakala perisian 9aaTAD pula digunakan untuk mengenal pasti domain 'transactivation' (<https://www.med.muni.cz/9aaTAD/index.php>) (Piskacek et al. 2016). Penentuan domain transmembran dilakukan dengan menggunakan perisian Phobius (Käll, Krogh & Sonnhammer 2007), TMHMM Server v. 2.0 (Krogh et al. 2001) dan Protter (Omasits et al. 2014).

HASIL

Bagi membuktikan secara molekul bahawa proses pengawanan kulat *G. boninense* dikawal atur oleh sistem pengawanan tetrakutub, pengenalanpastian lokus jenis pengawanan iaitu lokus matA dan matB telah dilakukan dalam kajian ini. Berdasarkan analisis yang dilakukan oleh Kües, James dan Heitman (2011) dan James et al. (2013), didapati bahawa lokus matA bagi kulat Agarikomisit kebiasaannya diapit oleh gen β -fg dan gen *mip*. Oleh itu, langkah pertama yang dilakukan bagi pencarian dan pengenalanpastian lokus matA adalah dengan mengenal pasti lokasi gen β -fg dan gen *mip* di dalam genom *G. boninense*

G3 dengan menggunakan jujukan rujukan seperti mana yang telah diberikan pada bahagian bahan dan kaedah. Berdasarkan analisis tBLASTn yang dilakukan, padanan gen *mip* dan gen β -fg telah ditemui pada pangkalan data genom *G. boninense* G3 masing-masing pada kedudukan 1980432 – 1977940 pb dan 2256087 – 2255428 pb pada *linkage group 2* (LG-2). Analisis tBLASTn menggunakan jujukan rujukan bagi HD1 dan HD2 (Kües et al., 2015) pula telah berjaya menemui gen *HD1* dan *HD2* yang terletak di antara gen *mip* dan gen β -fg pada LG-2, masing-masing pada lokasi 2253522 – 2254137 pb dan 2253292 – 2251790 pb. Analisis BLAST terhadap protein putatif HD1 pada pangkalan data NCBI menunjukkan persamaan jujukan sebanyak 63% dengan nilai ambang $2e^{-18}$ dengan HD1 (OSD03247.1) daripada *Trametes coccinea* manakala protein putatif HD2 pula menunjukkan persamaan jujukan sebanyak 78% dengan nilai ambang $4e^{-56}$ dengan protein HD2 (OSD03248.1) daripada *Trametes coccinea* dan persamaan jujukan sebanyak 75% dengan nilai ambang $4e^{-47}$ dengan protein HD2 (EMD41907.1) daripada *Gelatoporia subvermispora* B. Orientasi gen *HD1* dan *HD2* adalah berlawanan antara satu sama lain dan saiz bagi lokus matA ini adalah ~2.4 kb, iaitu lebih kecil berbanding dengan *Ganoderma* sp. yang telah dilaporkan iaitu ~3.6 kb (James et al. 2013; Kües et al. 2015). Struktur lokus mataA dan produk gennya adalah seperti Rajah 1(A).

Analisis penjajaran jujukan asid amino bagi protein HD1 dan HD2 yang telah dikenal pasti daripada kajian ini dengan jujukan HD1 dan HD2 daripada *Ganoderma* sp. 10597 SS1, *G. lucidum* BCRC 37177 dan *G. lucidum* G.260125-1 menunjukkan peratusan persamaan yang rendah walaupun antara genus yang sama. Beberapa kawasan penting seperti domain dimerisasi pada terminal-N, motif K/R, jujukan isyarat lokalisasi nukleus dan jujukan khusus bagi HD1 (Rajah 1(B)) dan HD2 (Rajah 1(C)) menunjukkan variasi jujukan yang tinggi berbanding motif pengikatan DNA (WFXNXXR) manakala terminal-C bagi kedua-dua protein adalah tidak terpuhara dan menunjukkan variasi yang sangat tinggi berbanding dengan protein HD1 dan HD2 daripada *Ganoderma* sp. yang lain. Analisis pohon filogeni telah menunjukkan bahawa protein HD1 dan HD2 yang telah dikenal pasti daripada kajian ini adalah terkelompok bersama-sama protein HD1 dan HD2 daripada kulat-kulat lain (Rajah 2).

Berbeza dengan lokus matA, penentuan lokasi lokus matB yang menempatkan gen *ste3* dan *phr* dilakukan dengan mengenal pasti kelompok gen *ste3* dan *phr* yang terdapat pada genom. Ini kerana, gen *ste3* dan *phr* yang terlibat dalam proses pengawanan seksual dilaporkan perlu berada secara berdekatan antara satu sama lain. Berdasarkan carian dan pemetaan gen *ste3* dan *phr* menggunakan jujukan rujukan, didapati bahawa lokus matB bagi genom

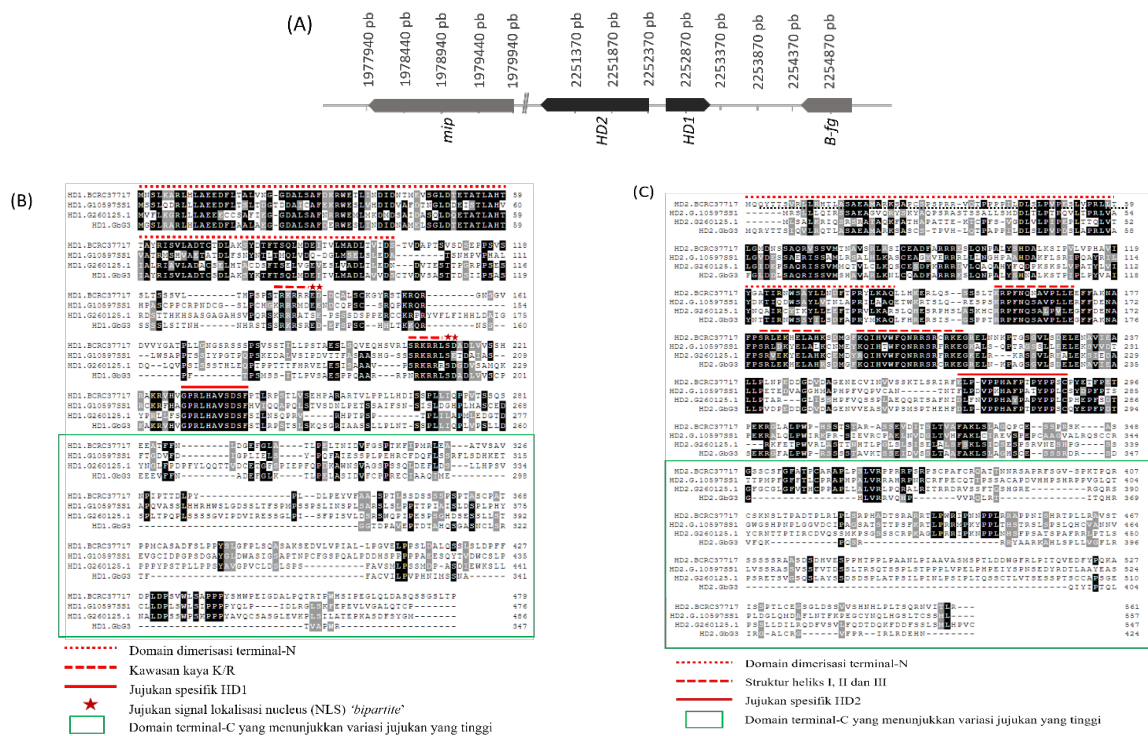
JADUAL 1. Senarai protein Ste3 rujukan yang digunakan dalam kajian ini

Bil	Protein ID/ No. Akses	Pangkalan data	Nama protein dan organisma	Rujukan
Protein Ste3 yang terlibat dalam pengawanan				
1	Y11081	NCBI	Protein Rcb2 daripada <i>C. cinerea</i>	Riquelme et al. (2005)
2	Y11080	NCBI	Protein Rcb3 daripada <i>C. cinerea</i>	Riquelme et al. (2005)
3	AAF01418.1	NCBI	Protein Rcb1.42 daripada <i>C. cinerea</i>	Riquelme et al. (2005)
4	AAF01419.1	NCBI	Protein Rcb2.42 daripada <i>C. cinerea</i>	Riquelme et al. (2005)
5	AAF01420.1	NCBI	Protein Rcb3.42 daripada <i>C. cinerea</i>	Riquelme et al. (2005)
6	P31302.1	NCBI	Protein Pra1 daripada <i>U. maydis</i>	Riquelme et al. (2005)
7	P31303.1	NCBI	Protein Pra2 daripada <i>U. maydis</i>	Riquelme et al. (2005)
8	CAA71963.1	NCBI	Protein Rcb2.6 daripada <i>Coprinopsis cinerea</i>	James et al. (2006)
9	CAA54915.1	NCBI	Protein Bar1 daripada <i>S. commune</i>	Riquelme et al. (2005)
10	CAA64453.1	NCBI	Protein Bbr1 daripada <i>S. commune</i>	Riquelme et al. (2005)
11	AAD35087.1	NCBI	Protein Bbr2 daripada <i>S. commune</i>	Riquelme et al. (2005)
12	EFI93340.1	NCBI	Protein Bbr2 daripada <i>S. commune</i> strain H4-8	Wirth et al. (2021)
13	AAB41858.2	NCBI	Protein Bbr1 daripada <i>S. commune</i> strain 4-40	Wirth et al. (2021)
14	Q92275.2	NCBI	Protein Bar1 daripada <i>S. commune</i>	Wendland et al. (1995)
15	P78741.2	NCBI	Protein Bbr1 daripada <i>S. commune</i>	Vaillancourt et al. (1997)
16	AAS46748.1	NCBI	Protein Ste3.3 daripada <i>P. djamor</i>	Riquelme et al. (2005)
17	HQ630590	NCBI	Protein Fv.STE3.1 daripada <i>F. velutipes</i>	van Peer et al. (2011)
18	HQ630591	NCBI	Protein Fv.STE3.2 daripada <i>F. velutipes</i>	van Peer et al. (2011)
19	52852 (Gansp. ste3.8-1)	JGI	Protein Ste3.8-1 daripada <i>Ganoderma</i> sp. strain 10597 SS1	Kües et al. (2015)
20	52995 (Gansp. ste3.4-1)	JGI	Protein Ste3.4-1 daripada <i>Ganoderma</i> sp. strain 10597 SS1	Kües et al. (2015)
21	120390 (Gansp. ste3.2-1)	JGI	Protein Ste3.2-1 daripada <i>Ganoderma</i> sp. strain 10597 SS1	Kües et al. (2015)
22	154663 (Gansp. ste3.5-1)	JGI	Protein Ste3.5-1 daripada <i>Ganoderma</i> sp. strain 10597 SS1	Kües et al. (2015)
23	Daripada kontig GaLu96scf_14_ctg_1 (G.260125-1. Ste3.2)	JGI	Protein Ste3.2 daripada <i>G. lucidum</i> strain G.260125-1	Kües et al. (2015)

continue to next page

continue from previous page

24	Daripada kontig GaLu96scf_14_ ctg_1 (G.260125-1. Ste3.3)	JGI	Protein.Ste3.3 daripada <i>G. lucidum</i> strain G.260125-1	Kües et al. (2015)
25	Daripada kontig GaLu96scf_14_ ctg_1 (G.260125-1. Ste3.4)	JGI	ProteinSte3.4 daripada <i>G. lucidum</i> strain G.260125-1	Kües et al. (2015)
26	Daripada kontig GaLu96scf_14_ ctg_1 (G.260125-1. Ste3.5)	JGI	Protein Ste3.5 daripada <i>G. lucidum</i> strain G.260125-1	Kües et al. (2015)
Protein Ste3 yang tidak terlibat dalam pengawanan (Ste3-NLS)				
1	2691538	JGI	Protein Brl4 daripada <i>S. commune</i> strain H4-8	Wirth et al. (2021)
2	2638261	JGI	Protein Brl3 daripada <i>S. commune</i> strain H4-8	Wirth et al. (2021)
3	1851	JGI	Protein CcSte3.2151 daripada <i>C. commune</i>	Foulongne-Oriol et al. (2021), Raudaskoski & Kothe (2010)
4	1852	JGI	Protein CcSte3.2153 daripada <i>iC. commune</i>	Foulongne-Oriol et al. (2021), Raudaskoski & Kothe (2010)
	HQ630591	NCBI	Protein Fv.STE3 daripada <i>F. velutipes</i>	
5	HQ630592	NCBI	Protein Fv.STE3.s1 daripada <i>F. velutipes</i>	van Peer et al. (2011)
6	HQ630594	NCBI	Protein Fv.STE3.s3 daripada <i>F. velutipes</i>	van Peer et al. (2011)
7	HQ630595	NCBI	Protein Fv.STE3.s4 daripada <i>F. velutipes</i>	van Peer et al. (2011)
8	Daripada kontig GaLu96scf_14_ctg Daripada kontig GaLu96scf_14_ ctg_1 (G.260125- 1.Ste3.1)	JGI	Protein Ste3.1 <i>G. lucidum</i> strain G.260125-1	Kües et al. (2015)
9	Daripada kontig GaLu96scf_14_ctg Daripada kontig GaLu96scf_14_ ctg_1 (G.260125- 1.Ste3.6)	JGI	Protein Ste3.6 <i>G. lucidum</i> strain G.260125-1	Kües et al. (2015)
10	Daripada kontig GaLu96scf_14_ctg Daripada kontig GaLu96scf_14_ ctg_1 (G.260125- 1.Ste3.7)	JGI	Protein Ste3.7 <i>G. lucidum</i> strain G.260125-1	Kües et al. (2015)

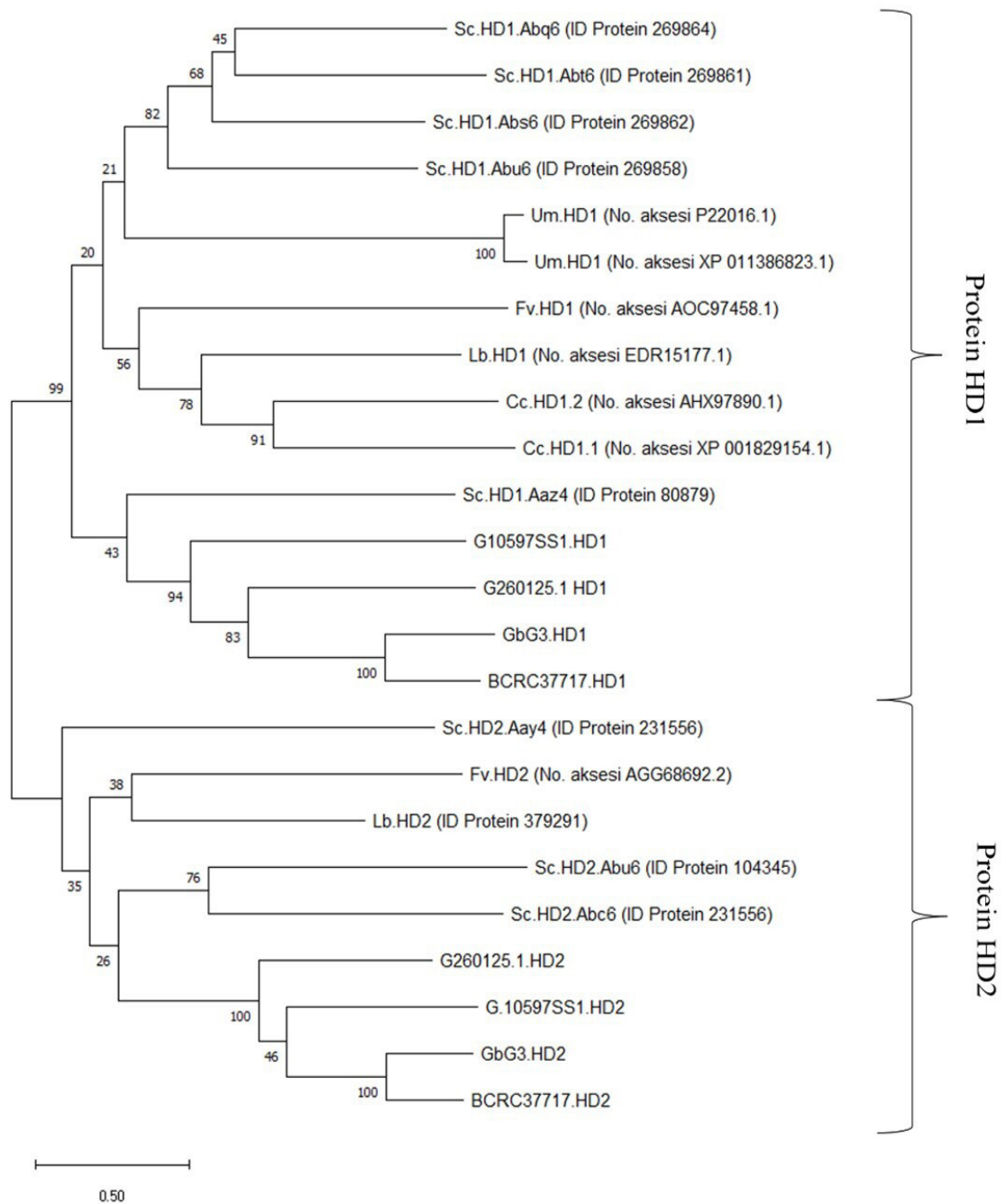


RAJAH 1. (A) Struktur lokus jenis pengawanan A (*matA*) pada LG-2 bagi kulat *G. boninense* yang dicadangkan berdasarkan analisis *tblastn* yang dilakukan menggunakan data genom *G. boninense* G3. Lokus *matA* ini diapit oleh gen *mip* dan β -*fg*, Kedudukan gen HD1 dan HD2 adalah bertentangan antara satu sama lain. Arah anak panah merujuk kepada orientasi gen putatif HD1 dan HD2, (B) Analisis penjajaran jujukan asid amino bagi protein HD1 dan HD2. Kehadiran jujukan dan motif terpelihara adalah seperti yang dilabelkan. Kehadiran jujukan dan motif terpelihara adalah seperti yang dilabelkan. Analisis penjajaran asid amino bagi protein HD1. HD1.BCRC37717 merujuk kepada protein HD1 daripada *G. lucidum* strain BCRC27717, HD1.G.10597SS1 bagi protein HD1 daripada *Ganoderma* sp. 10597 SS1, HD2.G260125.1 bagi protein HD1 daripada *G. lucidum* G.260125-1 dan HD2.GbG3 bagi protein daripada *G. boninense* G3 dan (C) Analisis penjajaran jujukan asid amino bagi protein HD2. HD2.BCRC37717 merujuk kepada protein HD2 daripada *G. lucidum* strain BCRC27717, HD2.G.10597SS1 bagi protein HD2 daripada *Ganoderma* sp. 10597 SS1, HD2.G260125.1 bagi protein HD2 daripada *G. lucidum* G.260125-1 dan HD2.GbG3 bagi protein daripada *G. boninense* G3

G. boninense G3 terletak pada *linkage group* 7 (LG-7). Sebanyak 8 gen *ste3* (*GbSte3.1* hingga *GbSte3.8*) putatif dan 5 gen *phr* (*GbPhr.1* hingga *GbPhr.5*) putatif telah berjaya dikenal pasti hadir pada lokus *matB* yang bersaiz ~73300 pb ini. Analisis penjajaran jujukan asid amino bagi protein *GbSte3.1* hingga *GbSte3.8* adalah seperti Rajah 3. Berdasarkan kepada analisis tersebut, didapati kesemua protein *Ste3* putatif yang telah dikenal pasti dalam kajian ini adalah berbeza antara satu sama lain.

Jadual 2 menunjukkan padanan gen, peratusan identiti jujukan dan nilai ambang bagi setiap gen putatif *ste3*. Selain itu, analisis peramalan domain transmembran menggunakan empat perisian iaitu Phobius, TMHMM Server v. 2.0, Protter dan TMPred Server menunjukkan tidak semua protein putatif *Ste* yang telah dikenal pasti

mempunyai tujuh domain transmembran, iaitu salah satu ciri bagi protein yang tergolong dalam keluarga protein reseptor G (G-Protein Couple Receptor, GPCR). Setiap protein *Ste3* yang dianalisis dianggap mempunyai tujuh domain transmembran sekiranya diramal sedemikian oleh sekurang-kurangnya oleh dua perisian peramalan yang digunakan. Ini kerana setiap perisian bioinformatik yang digunakan mempunyai pendekatan dan algoritma yang berbeza. Oleh itu, keputusan analisis peramalan domain transmembran yang diperoleh mungkin berbeza bagi setiap perisian yang digunakan. Berdasarkan kepada tetapan tersebut, hanya *GbSte3.3* hingga *GbSte3.8* sahaja yang diramalkan mempunyai tujuh domain transmembran manakala *GbSte3.1* dan *GbSte3.2* masing-masing hanya diramalkan mempunyai tiga dan lima domain transmembran



RAJAH 2. Analisis pohon filogeni protein putatif HD1 dan HD2 yang telah dikenal pasti dalam data genom *G. boninense* G3. Didapati bahawa protein HD1 dan HD2 yang telah dikenal pasti dalam kajian ini terkelompok bersama-sama dengan jujukan rujukan HD1 dan HD2 daripada kulat-kulat lain. (Sc: *S. commune*; Um: *U. maydis*, Lb: *L. bicolor*; Fv: *F. velutipes*; G10597SS1: *Ganoderma* 10597 SS1; G260125.1: *Ganoderma* G.260125.1; BCRC37717: *Ganoderma* BCRC 37717 dan GbG3: *G. boninense* G3. Pohon filogeni ML menggunakan model Poisson dengan 1000 replikasi 'bootstrap' dibina dengan menggunakan perisian MEGAX

sahaja. Analisis pohon filogeni terhadap protein Ste3 yang dikenal pasti dalam kajian ini dengan protein Ste3 rujukan menunjukkan tujuh daripada lapan protein putatif Ste3 iaitu GbSte3.2 hingga GbSte3.8 terkelompok bersama protein Ste3 yang diramalkan terlibat dalam proses pengawanan secara langsung (Rajah 4).

Carian BLASTP menggunakan jujukan peptida Phr daripada *Ganoderma* sp. seperti yang telah dilaporkan oleh Kües et al. (2015) dan carian secara manual pada lokus matB putatif tersebut berdasarkan kepada kehadiran motif pendek MDXF (X merujuk kepada mana-mana asid amino) pada terminal-N dan CAAX (C= sistina; A= asid amino alifatik dan X = semua jenis asid amino) pada terminal-C telah berjaya mengenal pasti lima gen phr putatif. Senarai protein pelopor feromon pengawanan yang telah dikenal pasti terletak pada lokus matB berserta lokasi di dalam genom, motif pendek MDXF pada terminal-N, CAAX pada terminal-C, peramalan jujukan lipopeptida matang serta kehadiran dua asid amino yang diramalkan terlibat dalam menentukan kekhususan terhadap protein Ste3 yang serasi adalah seperti yang Jadual 3. Anggaran saiz lipopeptida feromon yang matang adalah antara 10 hingga 18 asid amino. Struktur lokus matB adalah seperti Rajah 5.

Analisis pohon filogeni terhadap jujukan pelopor feromon pengawanan putatif bagi kulat ini yang telah dikenal pasti dengan jujukan feromon pengawanan daripada kulat *Ganoderma* sp. yang lain telah menunjukkan dua daripada lima Phr putatif iaitu GbPhr.1 dan GbPhr.2 terkelompok bersama Phr yang dilaporkan tidak terlibat dalam proses pengawanan secara langsung (Rajah 6).

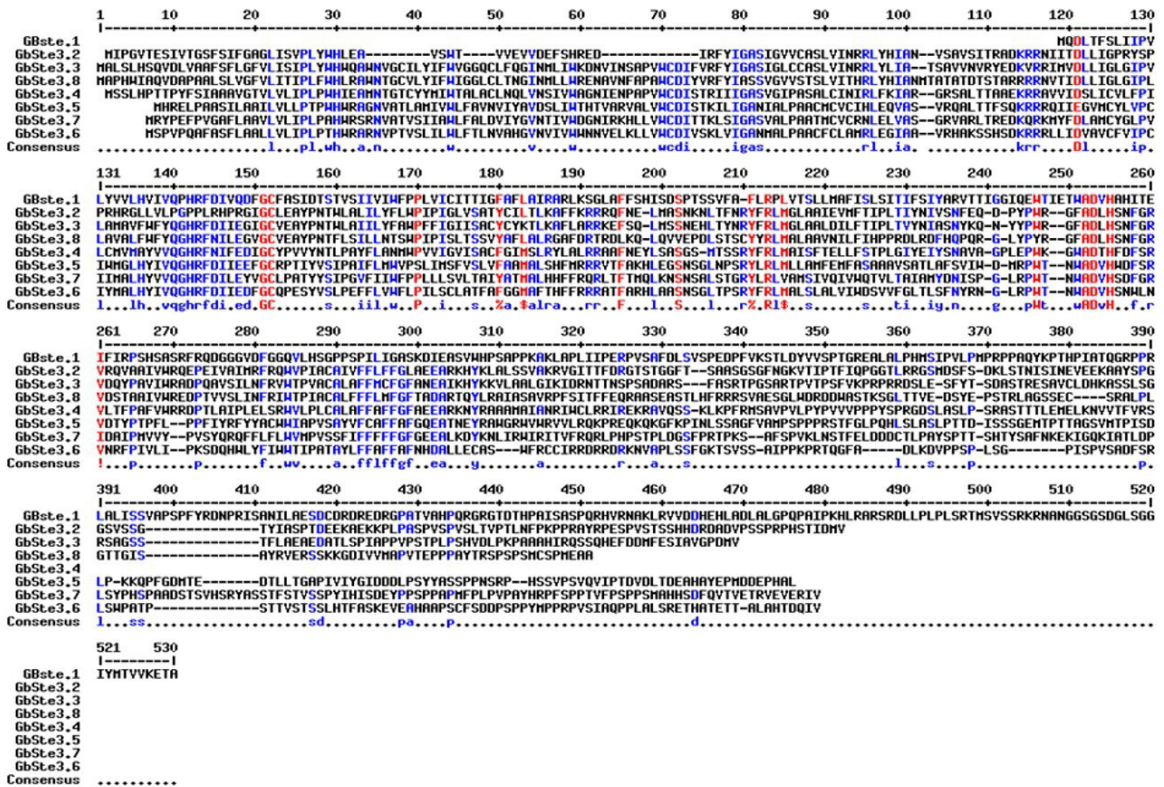
PERBINCANGAN

Pengawanan di dalam kulat merupakan proses yang melibatkan pelakuran di antara dua sel yang berlaku secara semula jadi dan bebas daripada aruhan gen jenis pengawanan. Sekiranya kedua-dua sel yang melakur itu adalah serasi untuk mengawan (ditentukan oleh gen jenis pengawanan), nukleus daripada pasangan serasi akan bermigrasi menerusi miselium ke arah pasangan masing-masing dan membentuk sel dwikarion (Auxier et al. 2021). Proses ini dikenali sebagai proses plasmogami (Clark-Cotton, Jacobs & Lew 2022). Tiada migrasi atau pertukaran mitokondria antara kedua-dua sel berlaku semasa proses pengawanan seksual bagi kulat basidiomiset (Vreeburg, Nygren & Aanen 2016). Fasa dwikarion ini akan berlarutan sehingga sel dwikarion menemui substrat yang sesuai untuk dikoloni dan membentuk struktur jasad buah yang akan mengaruh proses pelakuran antara dua nukleus heterologus (karyogami) sebelum menjalani fasa meiosis untuk menghasilkan basidiospora meiotik (Kothe 2001; Kües et al. 1998; Shirouzu, Osono & Hirose 2014). Pengawanan seksual boleh mempengaruhi kandungan

genetik yang dibawa oleh sel dwikarion dan juga progeni yang terhasil selepas proses meiosis (Taylor et al. 2017). Bagi kulat basidiomiset, pembentukan sel dwikarion boleh dikenal pasti dengan mencerap kehadiran struktur sambungan pengapit di bawah mikroskop cahaya (Clark-Cotton, Jacobs & Lew 2022).

Terdapat dua jenis sistem pengawanan seksual yang telah dilaporkan bagi kulat basidiomiset, iaitu sistem pengawanan dwikutub dan juga sistem pengawanan tetrakutub (Foulongne-Oriol et al. 2021). Sistem pengawanan dwikutub merujuk kepada proses pengawanan seksual yang dikawal atur oleh gen jenis pengawanan iaitu gen *HD1*, *HD2*, *ste3* dan *phr* yang berangkai dan terletak pada satu lokus jenis pengawanan yang sama (Foulongne-Oriol et al. 2021; Fraser & Heitman 2003; Fraser et al. 2007). Sistem pengawanan tetrakutub pula merujuk kepada sistem pengawanan seksual yang dikawal atur oleh dua lokus jenis pengawanan tidak berangkai yang dikenali sebagai lokus matA dan lokus matB (Wirth et al. 2021). Lokus matA menempatkan gen jenis pengawanan *HD1* dan *HD2* manakala lokus matB menempatkan gen jenis pengawanan *ste3* dan *phr*. Protein HD1 dan HD2 merupakan faktor transkripsi yang hanya berfungsi apabila protein HD1 berinteraksi dengan protein HD2 daripada jenis pengawanan yang berbeza untuk membentuk protein heterodimer HD1/HD2 (Foulongne-Oriol et al. 2021). Kajian yang dilakukan oleh Kües dan Casselton (1992) menunjukkan pembentukan protein heterodimer HD1/HD2 daripada jenis pengawanan yang berbeza akan membentuk tapak pengikatan DNA yang berfungsi untuk mengikat pada jujukan penggalak bagi mengaktifkan gen yang diperlukan bagi pembentukan sel dwikarion. Protein heterodimer HD1/HD2 berfungsi untuk mengaktifkan transkripsi gen yang terlibat dalam pemasangan nuklear, pembentukan struktur sambungan pengapit, mengawal atur pembahagian nuklear dan pembentukan septum pada struktur sambungan pengapit (Casselton & Olesnicky 1998). Fungsi protein Ste3 dan Phr pula adalah untuk mengaruh migrasi nuklear, pelarutan septum dan pelakuran antara struktur sambungan pengapit dengan hifa. Kesemua gen jenis pengawanan adalah penting bagi proses menyelenggara fasa dwikarion (Casselton & Olesnicky 1998; Srivilai & Loutchanwoot 2009).

Berdasarkan kepada analisis perlombongan data genom *G. boninense* G3 yang dilakukan, lokasi lokus matA yang menempatkan gen *HD1* dan *HD2* putatif telah berjaya dikenal pasti terletak pada LG-2. Orientasi kedua-dua gen *HD1* dan *HD2* putatif ini adalah berlawanan antara satu sama lain, sama seperti struktur lokus matA yang terdapat pada *Ustilago maydis*, *Ustilago hordei*, *Cryptococcus neoformans* dan *Ganoderma* sp. (Kües et al. 2015; Lee et al. 2010). Berdasarkan kepada penjajaran jujukan berbilang protein HD1 dan HD2 dengan jujukan rujukan



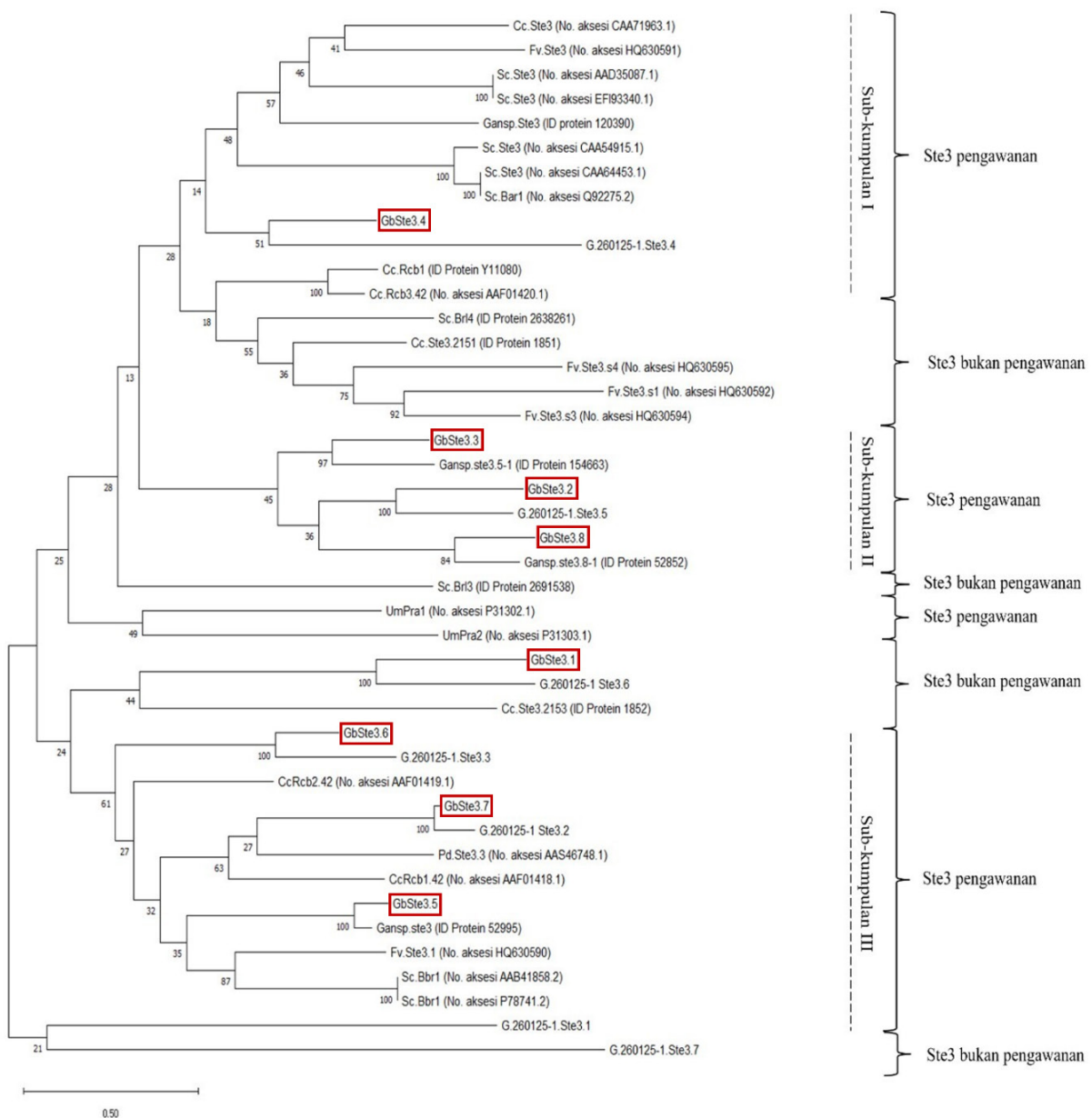
RAJAH 3. Analisis penjarangan jujukan asid amino bagi protein putatif *ste3* yang telah dikenal pasti dalam kajian ini. Kesemua protein putatif Ste3 menunjukkan variasi jujukan yang sangat tinggi dan tidak terpuhara antara satu sama lain. Tulisan berwarna hitam merujuk kepada jujukan yang tidak terpuhara, warna merah merujuk kepada jujukan yang terpuhara iaitu sekurang-kurangnya 90% daripada jujukan yang dianalisis menunjukkan jujukan yang sama pada lokasi tersebut dan warna biru merujuk kepada jujukan yang kurang terpuhara, iaitu sekurang-kurangnya 50% daripada jujukan yang dianalisis menunjukkan jujukan yang sama pada lokasi itu

JADUAL 2. Padanan gen mengekod protein Ste3 yang telah ditemui pada data genom *G. boninense* G3 dalam kajian ini

Gen <i>ste3</i>	Lokasi pada LG-7 (pb)	No. aksesii padanan gen	Peratusan identiti (%)	Nilai ambang
GbSte3.1	2199721-2198164	KAI1790870.1	94.0	2e ⁻⁶⁶
GbSte3.2	2203864-2205409	KAI1790869.1	72.11	0.0
GbSte3.3	2207044-2208555	KAI1790868.1	64.57	0.0
GbSte3.4	2217111-2215690	TFK87807.1	62.04	2e ⁻¹³⁵
GbSte3.5	2219249-2217679	KAI0742593.1	77.70	0.0
GbSte3.6	2223446-2224968	TBU29733.1	88.0	2e ⁻¹⁶⁵
GbSte3.7	2233542-2235143	KAI178265.1	90.65	0.0
GbSte3.8	2239167-2238236	TBU29728.1	72.0	2e ⁻¹³⁵

* Kotak kelabu – protein Ste3 yang diramalkan mempunyai 7 domain transmembran

* Protein putatif Ste3 yang ditebalkan merujuk kepada protein Ste3 yang diramalkan tidak terlibat dalam proses pengawanan secara langsung berdasarkan kepada analisis pohon filogeni

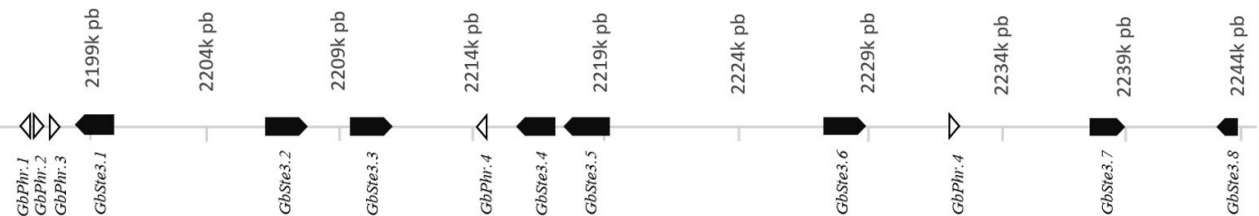


RAJAH 4. Analisis pohon filogeni protein putatif Ste3 yang telah dikenal pasti dalam data genom *G. boninense* G3. Pohon filogeni ML menggunakan model Poisson dengan 1000 replikasi 'bootstrap' dibina dengan menggunakan perisian MEGAX. (Cc merujuk kepada spesies *C. cinerea*, Fv merujuk kepada spesies *F. velutipes*, Sc merujuk kepada *S. commune*, Um merujuk kepada spesies *U. maydis*, Pd merujuk kepada spesies *P. djamor*, Gb merujuk kepada spesies *G. boninense*, Gansp merujuk kepada *Ganoderma* sp. strain 10597 SS1 dan G.260125-1 merujuk kepada spesies *G. lucidum* strain G.260125-1. Kotak merah menunjukkan kesemua protein Ste3 (GbSte3.1 hingga GbSte3.8) yang telah dikenal pasti dalam kajian ini

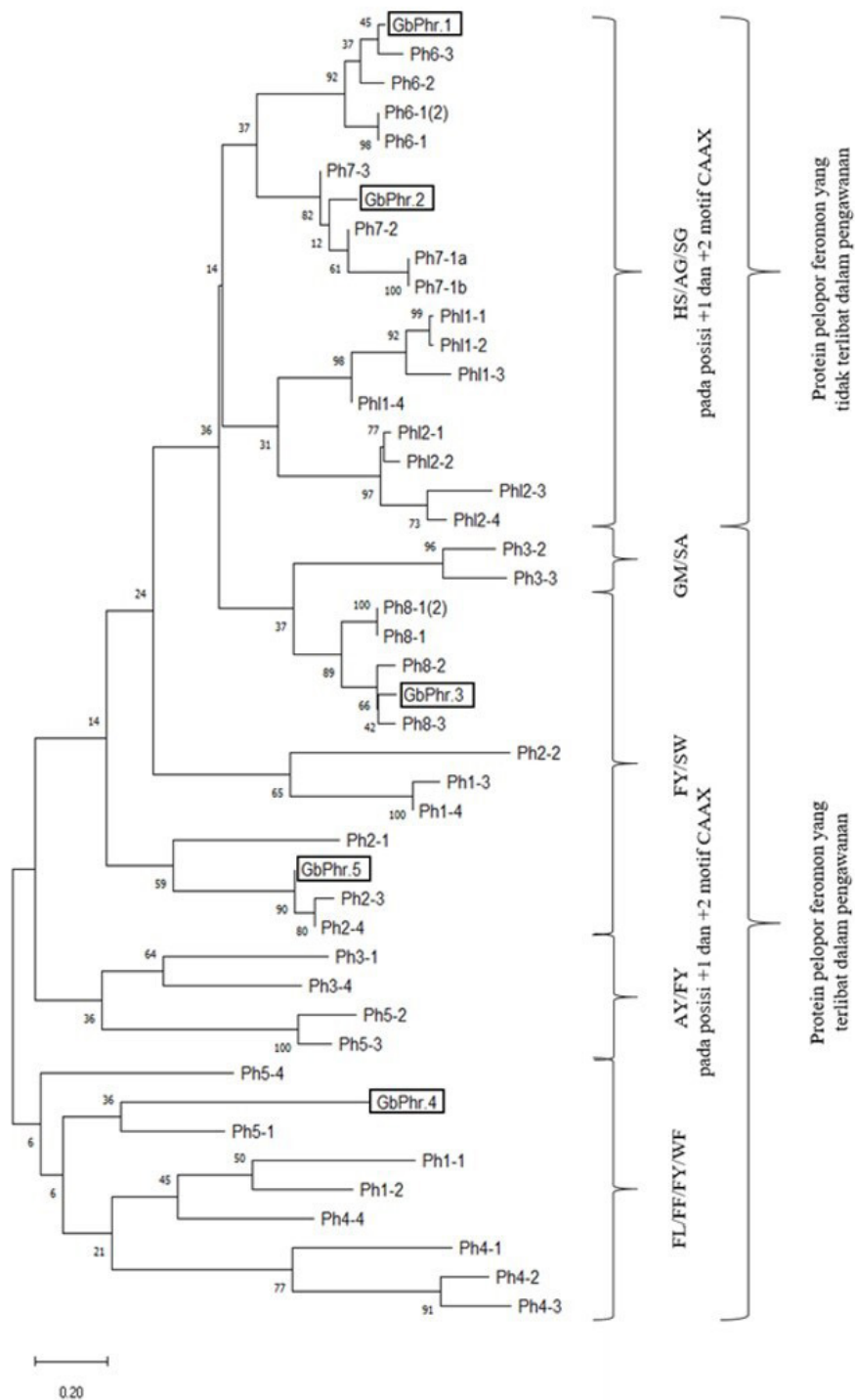
JADUAL 3. Senarai protein pelopor feromon yang telah dikenal pasti hadir dalam lokus matB berdasarkan kepada kehadiran motif MDXF pada terminal-N dan CAAX pada terminal-C

Lokasi pada LG-7 (pb)	Jujukan protein pelopor feromon	Saiz (asid amino)	Padanan protein dan nilai ambang
2165128-2164991	GbPhr.1 MDAFFVIASPIQADEPTSSSV EEIEE TFVDQD SLSNNYHsg CVIA	22	OSD04412.1 (5e ⁻⁰⁴)
2173701-2173820	GbPhr.2 MDAFFTISSPVPADPAV EEILVSAD STSSSEH sg CVIA	39	OSD03892.1 (2e ⁻⁰⁴)
2178765-2178646	GbPhr.3 MDAFFTIAAPVPVDEPAADV EFINYD DGGGDNH sg CTIA	39	N/A
2214854-2214672	GbPhr.4 MDTFLPLDLISMPLAGSDNGPGGAFL SSPTPDEEDTWDLPIDF EHSSGPDGS PKffCVIA	60	N/A
2232032-2232202	GbPhr.5 MDDFATFSAFLETEAVLQDQPSVDGP PAIMPPSDGVPVDM EYITGNSSSY sw CVVA	56	N/A

- * asid amino yang ditebalkan: pasangan asid amino terpulihara yang menjadi terminal-N bagi feromon pengawanan matang
- * asid amino huruf kecil: pasangan asid amino yang terletak pada posisi -1 dan -2 daripada motif CAAX yang terlibat dalam menentukan kekhususan protein reseptor feromon, Ste3 yang serasi
- * jujukan asid amino bergaris: jujukan lipopetida feromon pengawanan matang
- * jujukan asid amino berwarna merah: asid amino yang akan disingkirkan semasa pemprosesan terminal-C



RAJAH 5. Struktur lokus jenis pengawanan B (matB) pada LG-7 bagi kulat *G. boninense* yang dicadangkan berdasarkan analisis yang dilakukan menggunakan data genom *G. boninense* G3. Lokus matB ini terdiri daripada lapan gen putatif ste3 dan lima gen putatif phr. Arah anak panah merujuk kepada orientasi gen-gen putatif matB tersebut



RAJAH 6. Analisis pohon filogeni ML bagi protein pelopor feromon. Analisis ini menunjukkan protein phr terbahagi kepada dua kumpulan iaitu yang terlibat dalam pengawanan dan yang tidak terlibat dalam pengawanan. Model evolusi yang digunakan adalah Poisson dengan replikasi 'bootstrap' sebanyak 1000. Gb.Phr1 hingga Gb.Phr5 merupakan protein Phr yang dikenal pasti dalam kajian ini

daripada kulat *Ganoderma* sp. yang lain (Kües et al. 2015), kehadiran beberapa kawasan penting seperti domain dimerisasi pada terminal-N, motif K/R, jujukan isyarat lokalisasi nukleus, jujukan khusus bagi HD1 atau HD2 telah berjaya dikenal pasti. Selain itu, analisis penjajaran jujukan berbilang ini juga mendapati bahawa jujukan heliks homeodomain menunjukkan variasi jujukan yang tinggi berbanding motif pengikatan DNA (WFXNXR) (Rajah 1) dengan peratusan persamaan identiti bagi HD1 dan HD2, masing-masing sebanyak 35% dan 33%. Analisis bioinformatik lanjutan menunjukkan hanya protein HD1 sahaja yang mempunyai motif isyarat lokalisasi nukleus (NLS) 'bipartite' (Rajah 1(B)) iaitu sebanyak dua yang penting untuk membawa protein heterodimer HD1/HD2 yang terbentuk di dalam sitoplasma ke dalam nukleus (Riffiani et al. 2021). Protein HD2 pula menunjukkan kehadiran tiga struktur heliks (Rajah 1(C)) yang diperlukan untuk membentuk domain pengikatan DNA yang dikenali sebagai struktur 'helix-turn-helix' (HTH). Pengenalan dan pengikatan pada kawasan lekuk DNA promoter gen oleh domain HTH dilakukan oleh dua struktur α -heliks, iaitu satu struktur heliks yang terletak pada terminal-N dan satu lagi struktur heliks yang terletak pada terminal-C. Domain HTH ini mengikat pada lekuk DNA tersebut melalui pembentukan ikatan hidrogen dan interaksi Van de Waals dengan nukleotida yang terdedah pada kawasan tersebut. Struktur heliks yang berada di tengah-tengah domain HTH pula berfungsi untuk menstabilkan interaksi antara protein dan DNA (Aravind et al. 2005; Bartas et al. 2021). Secara ringkasnya, pembentukan protein heterodimer yang berfungsi adalah penting kerana setiap protein HD1 dan HD2 mempunyai kumpulan berfungsi, domain atau motif yang saling melengkapi. Contohnya, kehadiran motif NLS pada protein HD1 diperlukan untuk membolehkan translokasi protein heterodimer HD1/HD2 ke dalam nukleus berlaku manakala kehadiran domain HTH pada protein HD2 pula diperlukan bagi membolehkan pengikatan jujukan promoter gen responsif-a seperti gen yang terlibat dalam pemasangan nukleus bagi pembentukan sel dwikarion, pembentukan struktur sambungan pengapit, septum dan juga gen lain yang mungkin terlibat dalam kevirulenan kulat patogen dapat diaktifkan. Selain itu, kehadiran motif terpulihara pada setiap protein HD1 dan HD2 membolehkan protein ini terkelompok bersama-sama protein HD1 dan HD2 daripada kulat lain berdasarkan kepada analisis pohon filogeni (Rajah 2).

Selain itu, pengenalanpastian lokus matB juga telah berjaya dilakukan menggunakan data genom *G. boninense* G3. Lokus matB didapati terletak pada LG-7 dengan kehadiran 8 gen mengekod *Ste3* dan 5 gen mengekod *Phr*. Protein *Ste3* merupakan GPCR yang terletak pada transmembran sel. Kajian yang dilakukan oleh Kües et al. (2015) menunjukkan bilangan gen *ste3* bagi empat strain

Ganoderma yang dikaji adalah antara 8 - 9 gen manakala kajian yang dilakukan oleh Gao et al. (2018) terhadap kulat *Pleurotus tuoliensis* pula hanya menunjukkan kehadiran 5 gen *ste3*. Berdasarkan kepada penjajaran jujukan berbilang menggunakan jujukan asid amino bagi kelapan-lapan protein *Ste3* putatif, didapati bahawa terdapatnya variasi jujukan yang sangat tinggi antara jujukan tersebut dan membuktikan bahawa kelapan-lapan gen *ste3* tersebut merupakan alel yang berbeza (Rajah 3). Fungsi protein *Ste3* adalah untuk mengikat feromon pengawanan yang serasi dan mengaktifkan lata transduksi isyarat yang melibatkan protein kinase teraktif mitogen (MAPK) (Jones Jr. & Bennett 2011). Interaksi antara feromon dan protein *Ste3* ini pada awalnya akan mengaktifkan Gpa1 iaitu subunit α yang terdapat pada kompleks heterodimer G (kompleks $\alpha\beta\gamma$). Kemudian, subunit Gpa1 ini akan terpisah daripada kompleks heterodimer G tersebut dan seterusnya kompleks heterodimer G yang kini hanya mempunyai subunit $\beta\gamma$ akan mengaruhkan lata MAPK. MAPK seterusnya mengaktifkan beberapa protein pengawal atur transkripsi yang mempunyai domain HMGB (*high mobility gene box*) seperti *Rop1*, *Ste11*, *Ste11* dan *Prf12* (Heimel et al. 2010; Raudaskoski & Kothe 2010) yang seterusnya akan mengikat pada kawasan hulu jujukan penggalak bagi gen yang terlibat dalam pengawanan seksual termasuklah gen jenis pengawanan *HD1* dan *HD2* untuk mengaktifkan atau meningkatkan pengekspresannya. Saiz lokus matB yang telah dikenal pasti dalam kajian ini adalah lebih kurang ~73 kb. Saiz lokus matB adalah berbeza mengikut strain dan spesies kulat. Sebagai contoh, saiz lokus matB bagi *Ganoderma* sp. strain 10597 SS1 (~80 kb), *G. lucidum* strain XiangNong No.1 (~100 kb) dan *G. lucidum* strain G.260125-1 (90 kb) (Kües et al. 2015) manakala saiz lokus matB bagi *Coprinellus disseminatus* ialah ~50 kb dan *C. Cinerea*, 150 kb (James et al. 2006).

Salah satu ciri bagi protein GPCR ialah protein tersebut haruslah mempunyai tujuh domain transmembran (Liebscher et al. 2021). Walau bagaimanapun, berdasarkan kepada analisis peramalan kehadiran domain transmembran menggunakan empat perisian peramalan yang berbeza, didapati hanya 6 daripada 8 protein *Ste3* putatif sahaja yang diramalkan mempunyai tujuh domain transmembran (Jadual 1). Keadaan ini mungkin disebabkan oleh berlakunya kesilapan semasa himpunan genom yang menyebabkan perubahan pada jujukan gen yang diramalkan atau terdapat perbezaan antara rangka bacaan terbuka (ORF) yang sebenar berbanding dengan peramalan ORF secara *in-silico*. Kesilapan himpunan data boleh menyumbang kepada anotasi gen yang salah dan boleh menyebabkan kehilangan sebilangan besar jujukan gen yang akan mempengaruhi pencirian gen atau protein secara *in silico* (Acuña-Amador et al. 2018). Salah satu cara untuk mengatasi masalah ini adalah dengan melakukan

penjajaran Sanger menggunakan pasangan pencetus yang boleh mengamplifikasikan kawasan yang diinginkan atau mengulangi perhimpunan jujukan genom dengan menggunakan beberapa perisian yang berbeza (Guan et al. 2022; Midekso & Yi 2022).

Analisis pohon filogeni (Rajah 4) terhadap protein Ste3 putatif yang telah dikenal pasti dalam kajian ini menunjukkan tujuh daripada lapan protein Ste3 putatif dikelompokkan bersama dengan protein Ste3 yang terlibat dalam pengawanan dan satu protein Ste3 putatif sahaja terkelompok bersama protein Ste3 yang tidak terlibat dalam proses pengawanan secara langsung. Protein Ste3 putatif yang diramalkan tidak terlibat dalam proses pengawanan seksual dikenali sebagai Ste3-NMR dan dicadangkan untuk terlibat dalam pertumbuhan vegetatif hifa, mengawal pertumbuhan tidak simetri pada sel dwikarion, terlibat dalam komunikasi vegetatif antara spesies atau di antara ahli lain daripada spesies yang sama bagi mengelak daripada berlakunya proses hibridisasi (Coelho et al. 2017; Kües, James & Heitman 2011; Wirth et al. 2021). Kajian terhadap gen *ste3-NMR* dalam kulat *S. commune* menunjukkan bahawa reseptor feromon ini tidak dapat mengaruh aktiviti pengawanan. Terdapat tiga ciri bagi gen *ste3-NMR* iaitu mempunyai kawasan terminal-C yang lebih panjang, terletak jauh daripada gen yang mengekod pelopor feromon dan menunjukkan aras polimorfisme intrakhusus yang rendah (Coelho et al. 2017). Kehadiran terminal-C intrasel yang panjang adalah penting bagi menyediakan motif pengikatan protein yang pelbagai (termasuklah protein kinase) bagi mengaktifkan jaringan pengisyarat yang kompleks (Wirth et al. 2021). Gen *ste3-NMR* juga telah dilaporkan terdapat pada kulat *C. cinerea*, *Phanerochaete chrysosporium*, *L. bicolor*, *P. placenta*, *F. ventulipes* dan *Ganoderma* sp. (James et al. 2013; Kües, James & Heitman 2011; Martinez et al. 2009). Bilangan gen *ste3-NMR* adalah berbeza mengikut spesies. Sebagai contoh, lebih kurang 29 gen *ste3-NMR* telah dikenal pasti terdapat di dalam genom *Serpula lacrymans* (Coelho et al. 2017) manakala empat hingga lima gen pada *Ganoderma* sp. (Kües et al. 2015) dan empat pada *S. commune* (Wirth et al. 2021). Protein *Ste3-NMR* dicadangkan mungkin terlibat dalam pembentukan jasad buah monokarion atau terlibat dalam komunikasi vegetatif antara spesies atau antara ahli lain daripada spesies yang sama bagi mengelak daripada berlakunya proses hibridisasi (Kües, James & Heitman 2011).

Terdapat dua jenis feromon pengawanan yang dihasilkan oleh kulat iaitu feromon jenis- α yang akan mengikat pada protein reseptor feromon Ste2 dan feromon jenis-a yang akan mengikat pada protein reseptor feromon Ste3. Walau bagaimanapun, bagi kulat basidiomiset, kesemua feromon pengawanan yang dihasilkan adalah jenis-a. Berbeza dengan feromon jenis- α yang mempunyai

jujukan peptida isyarat (SP) yang membolehkan perembesan melalui tapak jalan perembesan klasik, feromon jenis-a adalah tidak mempunyai jujukan SP dan dirembeskan melalui protein pengangkut aktif. Feromon pengawanan jenis-a juga mempunyai dua motif pendek iaitu MDXF yang terletak pada terminal-N yang akan disingkirkan semasa proses pematangan feromon pengawanan dan motif CAAX yang terletak pada terminal-C yang diperlukan untuk proses farnesilasi iaitu penambahan kumpulan lipid dan karboksimetilasi untuk menjadikan molekul ini lebih bersifat hidrofobik dan boleh dilokalisasikan ke arah membran plasma sebelum berinteraksi dan dipindahkan ke luar sel oleh protein pengangkut feromon, Ste6. Berdasarkan kepada kehadiran kedua-dua motif tersebut, sebanyak 5 gen *phr* putatif telah ditemui terletak pada lokus matB (Jadual 2).

Analisis penjajaran jujukan asid amino bagi kesemua protein Phr pengawanan yang telah dikenal pasti dalam kajian ini dengan jujukan protein Phr daripada *Ganoderma* sp. yang lain (Kües et al. 2015) telah berjaya menunjukkan kehadiran sepasang asid amino yang terpulihara (sama ada EE, EF, EH dan EY) dan dianggap sebagai terminal-N bagi jujukan peptida feromon pengawanan yang matang dan sepasang asid amino sama ada SG, FF dan SW yang terletak bersebelahan dengan motif CAAX pada penghujung terminal-C (Jadual 2). Kajian yang dilakukan oleh Riquelme et al. (2005) menunjukkan kehadiran pasangan asid amino iaitu FW, WF, WW, GQ, GA atau TL yang terletak bersebelahan motif CAAX pada protein pelopor feromon bagi kulat *C. cinerea* mungkin memberikan kekhususan kepada feromon ini untuk hanya mengikat dan mengaktifkan reseptor tertentu sahaja.

Selain itu, analisis pohon filogeni terhadap protein Phr tidak menyokong pembentukan berdasarkan asal usul alel kerana analisis penjajaran oleh ClustalW dilakukan berdasarkan motif pendek MDXF dan CAAX yang masing-masing terletak pada jujukan protein pelopor feromon yang bersaiz di antara 22 hingga 60 asid amino. Walau bagaimanapun, berdasarkan analisis pohon filogeni, didapati bahawa jujukan protein pelopor feromon dikelompokkan berdasarkan dua asid amino yang terletak bersebelahan dengan motif CAAX. Sepertimana yang telah dilaporkan oleh Kües et al. (2015) dan Riquelme et al. (2005), jujukan asid amino ini mungkin menyumbang kepada interaksi antara feromon dengan protein reseptor feromon (Ste3) yang serasi. Analisis lanjutan harus dilakukan bagi mengetahui bagaimanakah dua hingga tiga jujukan asid amino yang terletak bersebelahan motif CAAX ini menentukan kekhususan protein reseptor feromon yang serasi. Selain itu, didapati bahawa protein Phr yang dikenal pasti dalam kajian ini terkelompok bersama protein Phr rujukan yang tidak terlibat dalam pengawanan mempunyai pasangan asid amino pada posisi -1 dan -2 daripada motif

CAAX yang sama, iaitu SG (serina dan glisina). Jujukan asid amino bagi protein Phr yang tidak terlibat dalam pengawanan ini juga menunjukkan persamaan jujukan yang tinggi iaitu dalam julat 66.7% hingga 100% dengan protein Phr daripada kulat *Ganoderma* sp. yang tidak terlibat dalam proses pengawanan seperti yang telah dilaporkan oleh Kües et al. (2015).

Kesimpulannya, penemuan kedua-dua lokus jenis pengawanan ini telah berjaya membuktikan secara molekul bahawa *G. boninense* mempunyai sistem pengawanan seksual tetrakutub. Sistem pengawanan tetrakutub ini membantu untuk meningkatkan kadar percampuran bahan genetik yang tinggi di dalam spesies tersebut dan seterusnya boleh mempengaruhi darjah keagresifan, kemandiran dan keupayaan untuk bertindak balas terhadap strategi pengawanan kulat seperti penggunaan racun kulat dan biokawalan di ladang-ladang sawit. Namun begitu kajian lanjutan yang melibatkan lebih banyak strain berbeza harus dilakukan bagi mengenal pasti bilangan alel khusus bagi gen *matA* dan gen *matB* yang terdapat pada kulat ini. Hasil daripada kajian lanjutan boleh digunakan sebagai asas untuk pembangunan kaedah yang sesuai untuk mengatasi masalah pemerebakan kulat ini di ladang-ladang sawit.

PENGHARGAAN

Projek ini dibiayai oleh Kementerian Pengajian Tinggi (KPT), Malaysia melalui geran *Fundamental Research Grant Scheme* (FRGS/1/2019/STG03/UKM/02/2). A.F.F.A.W. dibiayai oleh Biasiswa MyBrain15 daripada Kementerian Pendidikan, Malaysia.

RUJUKAN

- Ab Wahab, A.F.F., Ahmad Zairun, M., Mohd Daud, K.H., Abu Bakar, F.D., Bharudin, I. & Murad, A.M.A. 2022. Evaluation and improvement of protocols for *Ganoderma boninense* protoplast isolation and regeneration. *Malaysian Applied Biology* 51: 43-57.
- Acuña-Amador, L., Primot, A., Cadieu, E., Roulet, A. & Barloy-Hubler, F. 2018. Genomic repeats, misassembly and reannotation: A case study with long-read resequencing of *Porphyromonas gingivalis* reference strains. *BMC Genomics* 19: 54.
- Alexander, A., Sipaut, C.S., Dayou, J. & Chong, K-P. 2017. Oil palm roots colonisation by *Ganoderma boninense*: An insight study using scanning electron microscopy. *Journal of Oil Palm Research* 29: 262-266.
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M.M. & Iyer, L.M. 2005. The many faces of the helix-turn-helix domain: Transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 231-262.
- Auxier, B., Scholtmeijer, K., van Peer, A.F., Baars, J.J., Debets, A.J. & Aanen, D.K. 2021. Cytoplasmic mixing, not nuclear coexistence, can explain somatic incompatibility in basidiomycetes. *Microorganisms* 9(6): 1248.
- Bahari, M.N.A., Sakeh, N.M., Abdullah, S.N.A., Ramli, R.R. & Kadkhodaei, 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: 377.
- Bartas, M., Červeň, J., Guziurová, S., Slychko, K. & Pečinka, P. 2021. Amino acid composition in various types of nucleic acid-binding proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 22(2): 922.
- Bharudin, I., Ab Wahab, A.F.F., Abd Samad, M.A., Xin Yie, N., Zairun, M.A., Abu Bakar, F.D. & Murad, A.M.A. 2022. Review update on the life cycle, plant-microbe interaction, genomics, detection and control strategies of the oil palm pathogen *Ganoderma boninense*. *Biology* 11: 251.
- Bucci, G., Bentivoglio, D. & Finco, A. 2018. Precision agriculture as a driver for sustainable farming systems: State of art in literature and research. *Calitatea* 19: 114-121.
- Casselton, L.A. & Olesnický, N.S. 1998. Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 55-70.
- 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: 222-227.
- Chong, K.P., Dayou, J. & Alexander, A. 2017. Pathogenic nature of *Ganoderma boninense* and basal stem rot disease. In *Detection and Control of Ganoderma boninense in Oil Palm Crop*, edited by Chong, K.P., Dayou, J. & Alexander, A. Cham: Springer International Publishing. pp. 5-12.
- Clark-Cotton, M.R., Jacobs, K.C. & Lew, D.J. 2022. Chemotropism and cell-cell fusion in fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 86: e00165-00121.
- Coelho, M.A., Bakkeren, G., Sun, S., Hood, M.E. & Giraud, T. 2017. Fungal sex: The Basidiomycota. *Microbiology Spectrum* 5(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0046-2016>
- Defitri, Y. 2017. Identifikasi patogen penyebab penyakit tanaman sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) di Desa Bertam Kecamatan Jambi Luar Kota. *Jurnal Ilmiah Universitas Batanghari Jambi* 15: 129-133.
- Foulongne-Oriol, M., Taskent, O., Kües, U., Sonnenberg, A.S., van Peer, A.F. & Giraud, T. 2021. Mating-type locus organization and mating-type chromosome differentiation in the bipolar edible button mushroom *Agaricus bisporus*. *Genes* 12: 1079.

- Fraser, J.A. & Heitman, J. 2003. Fungal mating-type loci. *Current Biology* 13: R792-R795.
- Fraser, J.A., Hsueh, Y.P., Findley, K.M. & Heitman, J. 2007. Evolution of the mating-type locus: The basidiomycetes. In *Sex in Fungi: Molecular Determination and Evolutionary Implications*, edited by Heitman, J., Kronstad, J.W., Taylor, J.W. & Casselton, I.A. Washington: ASM Press. hlm. 19-34.
- Gao, W., Qu, J., Zhang, J., Sonnenberg, A., Chen, Q., Zhang, Y. & Huang, C. 2018. A genetic linkage map of *Pleurotus tuoliensis* integrated with physical mapping of the *de novo* sequenced genome and the mating type loci. *BMC Genomics* 19(1): 18.
- Govender, N. & Wong, M.Y. 2017. Detection of oil palm root penetration by *Agrobacterium*-mediated transformed *Ganoderma boninense*, expressing green fluorescent protein. *Phytopathology* 107: 483-490.
- Guan, D., McCarthy, S.A., Wood, J.M., Sims, Y., Chow, W., Ning, Z., Howe, K., Wang, G., Wang, Y. & Durbin, R. 2022. Genome sequence assembly evaluation using long-range sequencing data. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2022.05.10.491304>
- Heimel, K., Scherer, M., Schuler, D. & Kämper, J. 2010. The *Ustilago maydis* Clp1 protein orchestrates pheromone and b-dependent signaling pathways to coordinate the cell cycle and pathogenic development. *The Plant Cell* 22: 2908-2922.
- Hushiarian, R., Yusof, N.A. & Dutse, S.W. 2013. Detection and control of *Ganoderma boninense*: Strategies and perspectives. *SpringerPlus* 2: 555.
- James, T.Y., Srivilai, P., Kües, U. & Vilgalys, R. 2006. Evolution of the bipolar mating system of the mushroom *Coprinellus disseminatus* from its tetrapolar ancestors involves loss of mating-type-specific pheromone receptor function. *Genetics* 172: 1877-1891.
- James, T.Y., Sun, S., Li, W., Heitman, J., Kuo, H.-C., Lee, Y.-H., Asiegbu, F.O. & Olson, Å. 2013. Polyporales genomes reveal the genetic architecture underlying tetrapolar and bipolar mating systems. *Mycologia* 105: 1374-1390.
- Jones Jr., S.K. & Bennett, R.J. 2011. Fungal mating pheromones: Choreographing the dating game. *Fungal Genetics and Biology* 48: 668-676.
- Käll, L., Krogh, A. & Sonnhammer, E.L. 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Research* 35: W429-w432.
- Kothe, E. 2001. Mating-type genes for basidiomycete strain improvement in mushroom farming. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 602-612.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G. & Sonnhammer, E.L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal Of Molecular Biology* 305: 567-580.
- Kües, U. & Casselton, L.A. 1992. Homeodomains and regulation of sexual development in basidiomycetes. *Trends Genet* 8: 154-155.
- Kües, U., James, T.Y. & Heitman, J. 2011. 6 mating type in basidiomycetes: Unipolar, bipolar, and tetrapolar patterns of sexuality. In *Evolution of Fungi and Fungal-Like Organisms*, edited by Pöggeler, S. & Wöstemeyer, J. Heidelberg: Springer. hlm. 97-160.
- 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.
- Kües, U., Granado, J., Hermann, R., Boulianne, R., Kertesz-Chaloupková, K. & Aebi, M. 1998. The A mating type and blue light regulate all known differentiation processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Molecular and General Genetics* 260: 81-91.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.
- Kurihara, J., Koo, V.-C., Guey, C.W., Lee, Y.P. & Abidin, H. 2022. Early detection of basal stem rot disease in oil palm tree using unmanned aerial vehicle-based hyperspectral imaging. *Remote Sensing* 14: 799.
- Latifah Zakaria & Ho, Y.W. 2005. Morphological characteristics and somatic incompatibility of ganoderma from infected oil palm from three inland estates. *Malaysian Journal of Microbiology* 1(2): 46-52.
- Lee, S.C., Ni, M., Li, W., Shertz, C. & Heitman, J. 2010. The evolution of sex: A perspective from the fungal kingdom. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74: 298-340.
- Liebscher, I., Cevheroğlu, O., Hsiao, C.C., Maia, A.F., Schihada, H., Scholz, N., Soave, M., Spiess, K., Trajković, K., Kosloff, M. & Promel, S. 2021. A guide to adhesion GPCR research. *The FEBS Journal* 289(24): 7610-7630.
- 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: 356.
- Martinez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D., Schmoll, M., Kubicek, C.P., Ferreira, P., Ruiz-Duenas, F.J., Martinez, A.T. & Kersten, P. 2009. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 1954-1959.
- Midekso, F.D. & Yi, G. 2022. RFiller: A robust and fast statistical algorithm for gap filling in draft genomes. *PeerJ* 10: e14186.
- Miller, R.N.G., Holderness, M., Bridge, P.D., Chung, G.F. & Zakaria, M.H. 1999. Genetic diversity of *Ganoderma* in oil palm plantings. *Plant Pathology* 48: 595-603.

- Murphy, D.J., Goggin, K. & Paterson, R.R.M. 2021. Oil palm in the 2020s and beyond: Challenges and solutions. *CABI Agriculture and Bioscience* 2: 39.
- Nasehi, A., Sathyapriya, H. & Wong, M. 2020. First report of leaf spot on oil palm caused by *Phyllosticta capitalensis* in Malaysia. *Plant Disease* 104(1). <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-19-1232-PDN>
- Omasits, U., Ahrens, C.H., Müller, S. & Wollscheid, B. 2014. Protter: Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics* 30: 884-886.
- Parveez, G.K.A., Tarmizi, A.H.A., Sundram, S., Loh, S.K., Ong-Abdullah, M., Palam, K.D.P., Salleh, K.M., Ishak, S.M. & Idris, Z. 2021. Oil palm economic performance in Malaysia and R&D progress in 2020. *Journal of Oil Palm Research* 33(2): 181-214.
- Paterson, R.R.M. 2020. Oil palm survival under climate change in Kalimantan and alternative SE Asian palm oil countries with future basal stem rot assessments. *Forest Pathology* 50: e12604.
- 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.
- Pilotti, C.A. Sanderson, F.R. & Aitken, E.A.B. 2002. Sexuality and interactions of monokaryotic and dikaryotic mycelia of *Ganoderma boninense*. *Mycological Research* 106(11): 1315-1322.
- Piskacek, M., Havelka, M., Rezacova, M. & Knight, A. 2016. The 9aaTAD transactivation domains: From Gal4 to p53. *PLoS ONE* 11: e0162842.
- Pornsuriya, C., Sunpapao, A., Srihanant, N., Worapattamasri, K., Kittimorakul, J., Phithakkit, S. & Petcharat, V. 2013. A survey of diseases and disorders in oil palms of southern Thailand. *Plant Pathology Journal* 12: 169-175.
- Ramli, N.R., Mohamed, M.S., Seman, I.A., Zairun, M.A. & Mohamad, N. 2016. The potential of endophytic bacteria as a biological control agent for *Ganoderma* disease in oil palm. *Sains Malaysiana* 45(3): 401-409.
- Raudaskoski, M. & Kothe, E. 2010. Basidiomycete mating type genes and pheromone signaling. *Eukaryotic Cell* 9: 847-859.
- Riffiani, R., Chen, F.-C., Zhang, W., Wada, T., Shimomura, N., Yamaguchi, T. & Aimi, T. 2021. Identification, characterization and expression of A-mating type genes in monokaryons and dikaryons of the edible mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii* (Bunaharitake). *Mycoscience* 62(2): 106-114.
- Riquelme, M., Challen, M.P., Casselton, L.A. & Brown, A.J. 2005. The origin of multiple B mating specificities in *Coprinus cinereus*. *Genetics* 170: 1105-1119.
- Shirouzu, T., Osono, T. & Hirose, D. 2014. Resource utilization of wood decomposers: Mycelium nuclear phases and host tree species affect wood decomposition by Dacrymycetes. *Fungal Ecology* 9: 11-16.
- Sigrist, C.J., De Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B.A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L. & Xenarios, I. 2012. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Research* 41: D344-D347.
- Srivilai, P. & Loutchanwoot, P. 2009. *Coprinopsis cinerea* as a model fungus to evaluate genes underlying sexual development in basidiomycetes. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12: 821-835.
- Susanto, A., Sudharto, P. & Purba, R. 2005. Enhancing biological control of basal stem rot disease (*Ganoderma boninense*) in oil palm plantations. *Mycopathologia* 159: 153-157.
- Taylor, J.W., Branco, S., Gao, C., Hann-Soden, C., Montoya, L., Sylvain, I. & Gladieux, P. 2017. Sources of fungal genetic variation and associating it with phenotypic diversity. *The Fungal Kingdom* 5(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0057-2016>
- 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: W401-W407.
- Tusnady, G.E. & Simon, I. 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17: 849-850.
- Vaillancourt, L.J., Raudaskoski, M., Specht, C.A. & Raper, C.A. 1997. Multiple genes encoding pheromones and a pheromonereceptor define the Bb1 mating-type specificity in *Schizophyllum commune*. *Genetics* 146: 541-551.
- Van Peer, A.F., Park, S.-Y., Shin, P.-G., Jang, K.-Y., Yoo, Y.-B., Park, Y.-J., Lee, B.-M., Sung, G.-H., James, T.Y. & Kong, W.-S. 2011. Comparative genomics of the mating-type loci of the mushroom *Flammulina velutipes* reveals widespread synteny and recent inversions. *PLoS ONE* 6: e22249.
- Vreeburg, S., Nygren, K. & Aanen, D.K. 2016. Unholy marriages and eternal triangles: How competition in the mushroom life cycle can lead to genomic conflict. *Phil. Trans. R. Soc. B* 371: 20150533.
- Wendland, J., Vaillancourt, L., Hegner, J., Lengeler, K., Laddison, K., Specht, C.A., Raper, C.A. & Kothe, E. 1995. The mating-type locus B α 1 of *Schizophyllum commune* contains a pheromone receptor gene and putative pheromone genes. *EMBO J.* 14(21): 5271-5278.
- Wirth, S., Freihorst, D., Krause, K. & Kothe, E. 2021. What role might non-mating receptors play in *Schizophyllum commune*? *Journal of Fungi* 7: 399.

- Wong, W., Tung, H., Fadhilah, M.N., Midot, F., Lau, S., Melling, L., Astari, S., Hadziabdic, Đ., Trigiano, R. & Goh, K. 2021. Genetic diversity and gene flow amongst admixed populations of *Ganoderma boninense*, causal agent of basal stem rot in African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Sarawak (Malaysia), Peninsular Malaysia, and Sumatra (Indonesia). *Mycologia* 113: 902-917.
- Yusoff, A., M. Ashaari, F.H., Abd Samad, M.A., Ab Wahab, A.F.F. & Bharudin, I. 2021. Identification of soil bacteria with antifungus activity towards palm oil pathogen, *Ganoderma boninense*. *Sains Malaysiana* 50(12): 3557-3567.
- *Pengarang untuk surat-menyurat; email: munir@ukm.edu.my