

## تشخيص جزئي لعزلات محلية من الفطر *Aureobasidium pullulans*

زينة وجيه الجادر\* خالد دحام احمد محمد عبد الاله الشكرجي

قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة الموصل

جاسم محمد عبدو

مركز بحوث دھوك/ كلية الطب البيطري/ جامعة دھوك

\*E-mail: [Zena.algader@yahoo.com](mailto:Zena.algader@yahoo.com)

(أستلم 24/6/2018 ؛ فُبل 1/11/2018)

### المخلص

تم عزل عشرين عزلة فطرية محلية من جنس *Aureobasidium* من اوراق سليمة لأشجار الحمضيات المختلفة. وشخصت هذه العزلات الفطرية باستخدام الصفات المظهرية والزعرية وأظهرت النتائج أنها تعود الى النوع *A. pullulans*. كما اجري التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية باستخدام التفاعل التضاعفي المتخصص Specific-PCR واظهرت النتائج 17 حزمة من الـ DNA الجينومي المنقى من العزلات الفطرية المحلية بحجم واحد يتراوح ما بين (500-600) زوج قاعدة. وكانت هذه الحزم بحجم الحزمة نفسها التي تم الحصول عليها من العزلة القياسية *A. pullulans* NRRL 58560. وفي الوقت نفسه لم تظهر اية حزمة من الـ DNA نتيجة تفاعل الـ Specific- PCR الخاصة بالعزلات (Ap15 و Ap17 و Ap18) في هلام الاكاروز.

وحدد تسلسل القواعد النايتروجينية لنواتج التفاعل التضاعفي المتخصص specific PCR بعينات الـ DNA المأخوذة من ثلاث عزلات محلية منتخبة واظهرت نتائج التحليل باستخدام برنامج DNA Blast/NCBI وجود تشابه اكثر من 95% بين تسلسلات العزلات المحلية وتسلسلات السلالة القياسية *A. pullulans* المسجلة في بنك الجينات. كما رصدت الدراسة وجود طفرات نقطية ضمت طفرات استبدال او اضافة او حذف بعض القواعد النايتروجينية في بعض المواقع عند مقارنة التسلسلات العائدة للعزلات المحلية وتلك القياسية، وهذه الطفرات قد حدثت تلقائياً.

ارسلت نتائج التحليل هذه الى بنك الجينات باستخدام الموقع الالكتروني في الـ NCBI وأدخلت في بنك الجينات كعزلة قياسية واعطيت رقماً ورمزاً خاصاً بها في بنك الجينات على النحو الاتي: Ap1 KX964610، Ap1.sqn، Ap7.sqn، Ap7: KX964611، Ap14 KX964612، Ap14.sqn Ap14 وهذا يؤكد صحة النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة وصحة تشخيص العزلات المحلية قيد الدراسة.

الكلمات الدالة: *Aureobasidium pullulans*، NCBI، sequencing، Specific PCR.

---

## Molecular Identification of the Local Isolated Fungi *Aureobasidium pullulans*

Zena W. Al-gader

Khalid D. Ahmed

Mohammed A. Al-shakarchi

Department of Biology/ College of Education Pure Science/ University of Mosul

Jasem M. Abdo

College of Veterinary Medicine/ University of Duhok

**ABSTRACT**

Twenty fungal isolates of *Aureobasidium* were isolated from many healthy leaves of different citrus trees. Fungal isolates under study were identified by using morphological and cultural characters. The results revealed that the isolates are belonged to the species *A. pullulans*. Molecular identification of the isolated fungi were carried out using the specific-PCR reaction. The results showed 17 bands of purified genomic DNA from local fungal isolates of similar size ranging (500-600)bp. These bands have the same size to that obtained from the standard strain *A. pullulans* NRRL 58560. On the other hand, it did not show any band of the DNA as a result of the Specific-PCR reaction specialize of isolates (Ap15 and Ap17 and Ap18) in the agarose gel.

The sequence of the nitrogenous bases for the Specific PCR products were determined for three chosen local isolates. The results were analyzed using DNA Blast / NCBI program revealed that there is a similarity higher than 95% between these sequences and those of the standard strains of *A. pullulans* already recorded in the Gene Bank. Additionally, the point mutations whether they are substitution or addition or deletion were observed in some positions of the nitrogenous bases after comparing the sequences of the tested local isolates and the standard. These mutations may occur spontaneously.

This analysis results sent to GenBank using the website of the NCBI and introduced in GenBank record as standard isolates and given a cod number in the GenBank as follows: Ap1.sqn Ap1 KX964610, Ap7.sqn Ap7: KX964611, Ap14.sqn Ap14 KX964612 This confirms the validity of the results obtained in this study and diagnosis of the validity of the local isolates under study.

**Keywords:** *Aureobasidium pullulans*, NCBI, sequencing, Specific PCR.

**المقدمة**

يعد الفطر *Aureobasidium pullulans* احد اهم الفطريات المنتجة للسكريات المتعددة المهمة صناعياً وهو البوليولان. هذا الفطر من الفطريات الرمية التغذية التي تعود الى عائلة Dothideaceae تحت رتبة Dothideales التابعة لصف Ascomycetes (Yurlova and de Hoog, 1997) التي لها القدرة على انتاج صبغة الميلانين التي تتراكم في جدران خلاياها. وينتشر هذا الفطر بشكل واسع في البيئة اذ امكن عزله من التربة ومن بقايا النباتات والخشب والصخور وسطوح الحمامات وكذلك الغبار المنزلي ومن الاماكن الرطبة في المنازل اضافة الى العزلات التي عزلت من شعر واصافر وجلد الانسان (Hawkes et al., 2005 ; Perez et al., 1997). وعلى الرغم من ان عدداً كبيراً من هذا الفطر عزل في تايلند الا انه لوحظ وجود مدى واسع من التباين المظهري والخصائص الفسلجية بين العزلات حيث ان معظم هذه العزلات تم عزلها من سطوح اوراق النباتات بينما هناك عدد قليل تم عزله من الاسطح غير الحية (Prasongsuk et al., 2005).

ويعد الفطر *A. pullulans* من الفطريات الخيطية الشبيهة بالخمائر، ويعود سبب ذلك الى أن له اشكال متعددة polymorphic يمر بها خلال دورة حياته اذ يتكون من خيوط فطرية Mycelia وشكل احادي الخلية (شبيه بالخميرة Yeast Like cell) وابواغ برعمية Blastospores وابواغ كونيديية Conidiospores وابواغ كلاميديية Chlamydospores (Punnapayak et al., 2003).

وتخزن المعلومات الوراثية Genetic Information في جزيئة DNA للخلية وهذه المعلومات تحدد الطبيعة التركيبية والايضية لهذا الكائن، والمحتوى الوراثي للابواغ مقسم الى قطع تسمى المورثات Genes وهي تسلسل من النيوكليوتيدات تمتلك وظائف متخصصة بعضها يشفر بناء جزيئة RNA وبروتين وتدعى بـ : مورثات تركيبية Structural Genes وبعضها الاخر له وظائف تنظيمية في السيطرة على الفعالية الخلوية تسمى المورثات المنظمة Regulatory Genes (Paolella, 1998). وظهرت الدراسات مدى التباين الوراثي ما بين الانواع المدروسة باستخدام البصمة الوراثية عن طريق استخدام Random RAPD-PCR

Restriction Fragment Length Polymerase Chain Reaction وتقنية تحليل تباين اطوال قطع التقييد (Dunber *et al.*, 2001 ; Edwardes and Turco, 2005) (RFLP) Polymorphism.

#### مواد وطرائق العمل

#### عزل العزلات المحلية Isolation Local Isolates

تم جمع العزلات من اوراق غير مصابة لنباتات مختلفة حسب طريقة Pollock (1992) باستخدام الوسط السائل المتكون من مما يأتي ( غم/لتر من الماء المقطر):

10غم من السكروز و 1غم من  $(NH_4)_2HPO_4$  و 0.5 غم من NaCl و 0.05 غم من  $MgSO_4.7H_2O$  و 2 غم من  $K_2HPO_4$  و 0.02 غم لكل من  $ZnSO_4$  و  $MnSO_4$  و  $FeSO_4$  وتم ضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.0 وعقم بجهاز المعقم عند ضغط 1 جو ودرجة حرارة  $121^{\circ}C$  ولمدة 15 دقيقة.

#### تحضير اللقاح

تم تحضير اللقاح حسب طريقة Ono (1977) ويتكون وسط اللقاح من المكونات الاتية (غم/لتر): 50 غم من الكلوكوز و 5 غم من  $K_2HPO_4$  و 1 غم من NaCl و 0.2 غم من  $MgSO_4.7H_2O$  و 0.6 غم من  $(NH_4)_2SO_4$  و 2.5 غم من Yeast extract وضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.0 وعقم الوسط بجهاز المعقم عند ضغط 1 جو ودرجة حرارة  $121^{\circ}C$  ولمدة 15 دقيقة.

#### عزل وتنقية الـ DNA الجينومي:

تم عزل الـ DNA الجينومي من عزلات الفطر *A. pullulans* باستخدام Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) حيث اخذ 1 مل من المزرعة الفطرية النامية على وسط اللقاح واجريت عليها عملية النبذ المركزي بسرعة 13000 دورة 1 دقيقة ولمدة 2 دقيقة ودرجة حرارة  $4^{\circ}C$ . وسكب الراشح وعلق الراسب الفطري بـ 293 مايكروليتر من محلول 50 mM EDTA وبعد المزج اجريت عليها عملية النبذ المركزي كما في الخطوة السابقة، وسكب الراشح وعلق الراسب الفطري بـ 600 مايكروليتر من محلول Nuclei Lysis وبعد المزج اجري على الطريقة بعض التحوير باستخدام طريقة التجميد والتسخين لمدة 10 دقائق وكررت هذه العملية عدة مرات للتأكد من تحلل جدار الخلايا (Hammo, 2013).

وأضيف 100 مايكروليتر من محلول ترسيب البروتين (Protein Precipitation Solution) إلى المزيج وبعد تحريكه حضن بحمام ثلجي لمدة خمس دقائق أعقبته عملية النبذ المركزي بسرعة 13000 دورة /دقيقة ولمدة 3 دقائق ودرجة حرارة  $4^{\circ}C$ . ثم نقل الراشح إلى أنبوبة نظيفة ومعقمة يضم 300 مايكروليتر من كحول الايزوبروبانول بدرجة حرارة المختبر وتم تحريك المزيج بقلب الانبوب الى الاعلى والاسفل، وأجريت عملية النبذ المركزي وبالظروف المذكورة انفا. سكب الراشح وغسلت الخلايا بـ 300 مايكروليتر من 70% ايثانول ودرجة حرارة المختبر. وجفف الراسب بالهواء بمدة لا تقل عن 10 إلى 15 دقيقة وعلق الراسب بـ 50 مايكروليتر من محلول DNA Rehydration (Rehydration solution) ثم اضيف الى المزيج 1.5 مايكروليتر من انزيم RNase وحضن بدرجة حرارة  $37^{\circ}C$  لمدة 15 دقيقة بعدها حفظ بدرجة حرارة  $4^{\circ}C$  لحين الاستخدام.

#### التفاعل المتسلسل المتبلر المتخصصي Specific PCR

تم إجراء هذا التفاعل في مركز دهوك للبحوث (Duhok Research Center (DRC) / كلية الطب البيطري/ جامعة دهوك باستخدام البرايمرات التخصصية IST5 forward ( $5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG^3$ ) و IST4 ( $5'TCCTCCGCTTATTGATATGC^3$ ) revers (White, 1990) باستخدام انابيب PCR PreMix الموجودة ضمن (Bioneer)Kit. وكل أنبوب تفاعل أضيف له 10 بيكومول من كل من البرايمرات و 100 نانوغرام من الـ DNA واكمل الحجم

الى 20 مايكروليتر بالماء المقطر المعقم. ووضعت الأنابيب في جهاز المبلر الحراري (Thermocycler Eppendorf ) /Mastercycler /Germany ) وتم برمجة الجهاز حسب طريقة Ray (2004) ضمن البرنامج الاتي:  
 أولاً: مسخ الـ DNA عند درجة حرارة 95° م ولمدة 3 دقيقة.

ثانياً: 34 دورة وتتضمن:

1- مسخ الـ DNA عند درجة حرارة 95° م ولمدة 1 دقيقة.

2- ارتباط البادئات بقطعة DNA عند درجة حرارة 58° م ولمدة 1 دقيقة.

3- الاستطالة عند درجة حرارة 74° م ولمدة 3 دقيقة .

ثالثاً: مرحلة الاستطالة النهائية 74° م ولمدة 10 دقائق.

بعد انتهاء فترة البرنامج رحلت العينات على هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % ولمدة 45 دقيقة تحت فرق جهد 120 فولت وكشف عن نتائج التفاعلات باستخدام جهاز (visualized ultra-violet (UV) Transillumination (Vilber Lourmat ) (Made In Ess).

### تعيين تسلسل القواعد النيتروجينية لنواتج التفاعل التضاعفي المتخصص لـ Specific PCR

تم تعيين تسلسل القواعد النيتروجينية لقطع الـ DNA الناتجة من التفاعل التضاعفي المتخصص لثلاث عزلات محلية (Automatic Sequencer Applied Biosystem GenitiveAnalyzer ) باستخدام جهاز (Ap14 و Ap7 و Ap1) وبواسطة (Big Dye<sup>®</sup> Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem, USA) في مركز الجينوم/ كلية العلوم والصحة/ جامعة كويا/ اقليم كردستان/ العراق .

### تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية لنواتج التفاعل التضاعفي المتخصص Specific PCR وتعيين المخطط الشجري

اجري تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية لنواتج التفاعل التضاعفي المتخصص في مركز دهوك للبحوث /DRC /كلية الطب البيطري/ جامعة دهوك باستخدام برنامج DNASTAR/Laser Gene وتم تجميع التسلسلات لكل عينة كلا على حدة في SeqMan (DNASTAR/Laser gene, Madison, WI) وحررت جميع التسلسلات باستخدام المعاينة البصرية. ثم أدخلت تسلسلات العينات في برنامج NCBI BLAST الذي يرسلها الى ابحاث الجينوم في بنك الجينات عن طريق الرابط الالكتروني (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) لتحديد التسلسلات الموجودة والمسجلة ضمن بنك الجينات والمشابهة للتسلسلات قيد الدراسة.

ولتصنيف تسلسلات العينات قيد الدراسة واكتشاف العلاقة بينها وبين تسلسلات أخرى استخدمت أدوات البرنامج MOLE BLAST لتحديد التسلسلات الاقرب صلة والاكثر قرابة من الناحية التصنيفية، اذ تم الحصول على مخطط شجري يوضح هذه العلاقة التصنيفية عن طريق الرابط الالكتروني:

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/moleblast/moleblast.cgi>)

### النتائج والمناقشة

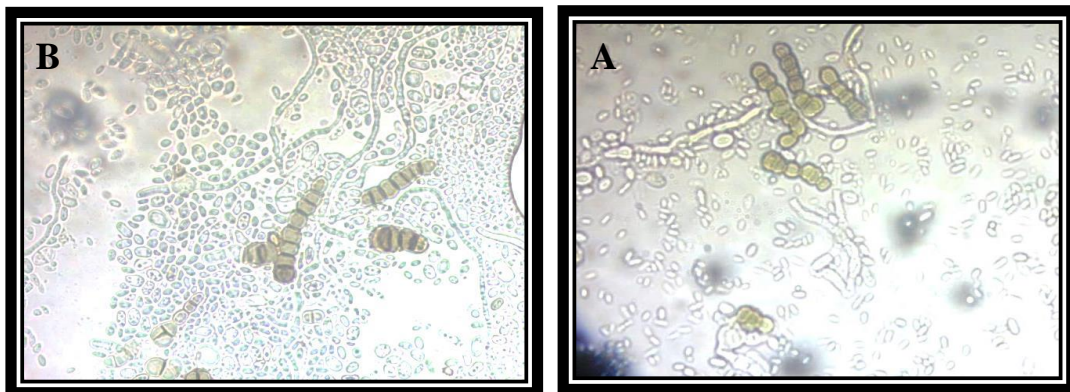
#### تشخيص العزلات المحلية

تم الحصول على العزلات الفطرية المحلية من مصادر عديدة واوراق نباتات مختلفة وشخصت بشكل مبدئي بالاعتماد على الشكل الخارجي Morphology للمستعمرات، فقد كانت المستعمرات ذات الوان متباينة ما بين (الاسود والوردي والكريمي) وظهر قسم من المستعمرات جلدية القوام تميزت بلونها الاسود نتيجة لإفرازها صبغة الميلانين التي تمتاز بإنتاجها الفطر A. pullulans (Wu et al., 2012 ; Manitchotpsit, 2011). في حين ان القسم الاخر من المستعمرات امتازت بكون

سطوحها مرتفعة ذات حافات ملساء مخاطية القوام عالية اللزوجة (الشكل، 1). ونظرا للانتشار الواسع لهذا الفطر فان عددا كبيرا من السلالات والعزلات تم عزلها من مصادر عديدة لا يمكن احصاؤها وقد وردت كثير من سلالات الفطر في مختلف البحوث والدراسات العلمية وقد عزلت من مصادر متعددة (Leathers, 2003). كما فحصت عينات الفطر تحت المجهر ولوحظ فيها تعددية الاطوار اذ ظهر فيها الطور الخميري وحيد الخلية، والطور الخيطي متعدد الخلايا وطور الكلاميدوسبور (السيورات الكلاميدية) (الشكل، A-2) وتمت مقارنتها بالعزلة القياسية للفطر *A. pullulans* NRRL58560 فأظهرت تطابقاً تاماً (الشكل، B-2) وهذا يطابق وصف (Prasongsuk *et al.*, 2005) من حيث الشكل الخارجي Morphology للمستعمرات وتعددية الاشكال. ويتفق مع ما ذكره (Sugumaran, 2013 Wu *et al.*, 2012; Gaur and Singh, 2010;) حول تعددية الاشكال polymorphic التي يتميز بها الفطر *A. pullulans*.



الشكل 1: الشكل المظهري لمزارع العزلات المحلية للفطر *A. pullulans*



الشكل 2: A- تعدد الاشكال المظهرية للفطر *A. pullulans* العزلة المحلية  
B- العينة القياسية للفطر *A. pullulans* NRRL58560

عزل الـ DNA الـ

بعد عزل الـ DNA الجينومي للعزلات المحلية من الفطر *A.pullulans* و إجراء الترحيل الكهربائي لعينات الـ DNA المنقاة باستخدام هلام الـ Agarose بتركيز 0.7% تم تعريض الهلام للأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي (254 نانوميتر) في جهاز UV Transilluminator للكشف عن حزم الـ DNA الجينومي في العينات قيد الاختبار. وظهرت حزم من الـ DNA متساوية في الحجم لانها رحلت بمسافات متساوية وذات حجم كبير وذلك لصغر المسافات التي قطعتها في هلام الاكاروز لجميع عينات الـ DNA الجينومي المنقاة من العزلات الفطرية المحلية.

#### التفاعل التضاعفي المتخصص للـ DNA الجينومي

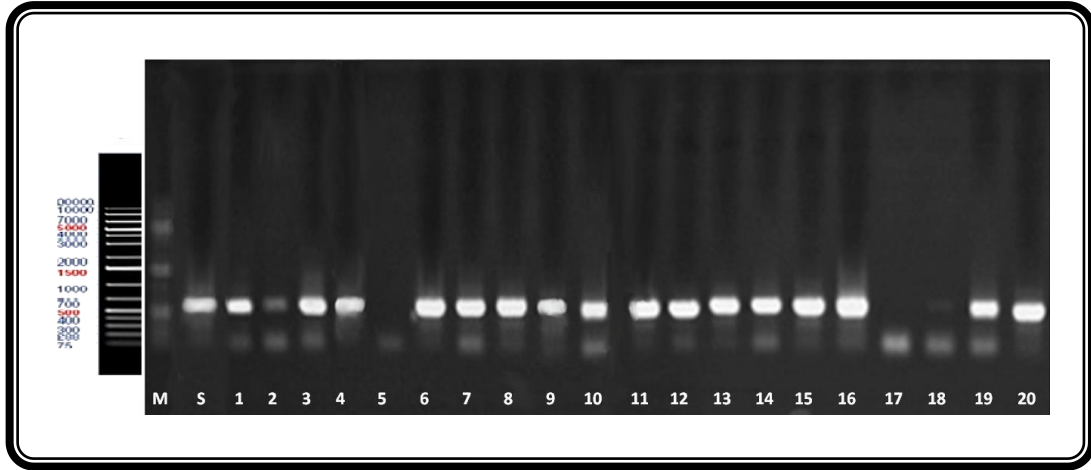
اجري التفاعل التضاعفي المتخصص لعينات الـ DNA المنقاة من العزلات المحلية باستخدام البادئ ITS5 foreword ( $5'$ TCCTCCGCTTATTGATATGC $3'$ ) و ITS4 revers ( $5'$ GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG $3'$ ) (Hammo, 2013) والشكل (3) يوضح النتائج.

ومن الشكل (3) لوحظت 17 حزمة من الـ DNA المنقى من العزلات الفطرية المحلية بحجم واحد يتراوح ما بين (500-600) زوج قاعدة، وهي ناتجة من التفاعل التضاعفي المتخصص لعينات الـ DNA المنقاة من العزلات المحلية (AP1 و AP2 و AP3 و AP4 و AP6 و AP7 و AP8 و AP9 و AP10 و AP11 و AP12 و AP13 و AP14 و AP15 و AP16 و AP19 و AP20). وبمقارنتها بحزمة الـ DNA المنقاة من العزلة القياسية *A.pullulans* NRRL 58560 وجد انها تمتلك الحجم نفسه وان ظهور هذه الحزم من الـ DNA كان نتيجة وجود تسلسلات مشتركة ومتشابهة في تسلسل قواعد النروجينية في الـ DNA الجينومي لهذه العزلات التي استطاعت ان تتم تلك الموجودة في البادئين واحداث التفاعل المتخصص وتوليد حزم الـ DNA ذات الاحجام المتشابهة.

ولم تظهر أية حزمة من الـ DNA نتيجة التفاعل التضاعفي المتخصص الخاص بالعزلات (Ap5 و Ap17 و Ap18) في هلام الاكاروز. وربما يعود ذلك الى فشل ارتباط الـ DNA القالب بالبادئ، أو الى عدم وجود تسلسلات من القواعد النيتروجينية في الـ DNA الجينومي لهذه العزلات التي لها امكانية ارتباطها بالبادئ.

ان هذه النتائج التي تم الحصول عليها تتفق مع ما توصل إليه (Martini et al., 2009) عند استخدامه تقنية التفاعل التضاعفي المتخصص لتوصيف عينات الـ DNA الجينومي المنقاة من عزلات الفطر *A.pullulans* وكان حجمها يتراوح ما بين (500-600) زوج قاعدة باستخدام البادئ ITS1 و ITS2. وكذلك تمكن (Alam et al. 2009) باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي المتخصص من تشخيص 9 عزلات محلية من الفطر *Pleurotus nebrodensis* وكان حجم قطع الـ DNA الناتجة من التفاعل يتراوح بين (575-625) زوج قاعدة.

وفي دراسة لـ (Ganeshamoorthi and Dubey 2013) على 50 عزلة من الفطر *Rhizoctonia solani* في اثناء التفاعل التضاعفي المتخصص باستخدام البادئات ITS1 و ITS4 ظهرت حزم من الـ DNA بحجم واحد لجميع العزلات بلغ عددها (650) زوج قاعدة.



الشكل 3: نتائج التفاعل التضاعفي المتخصص للعزلات الفطرية المحلية

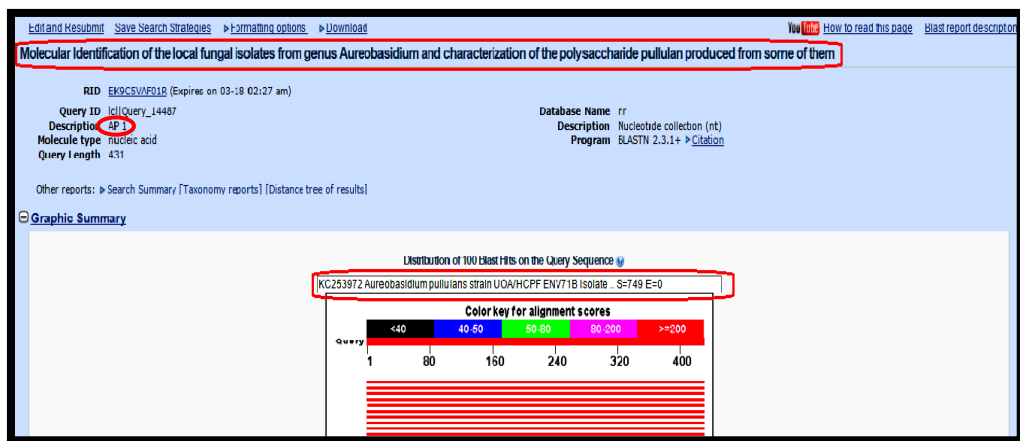
(S) العزلة القياسية *A. pullulans* NRRL58560 عزلات الفطر *A. pullulans* (20 -1)  
Marker #SM1331 Gene Ruler Fermentas (M)

دراسة وتحليل تسلسل القواعد النايروجينية لنواتج التفاعل التضاعفي المتخصص الـ Specific PCR

أخذت نواتج التفاعل التضاعفي المتخصص Specific PCR لعينات الـ DNA المنقاة من ثلاث عزلات محلية التي اختيرت من بين 17 عزلة اعطت نتيجة موجبة في تفاعل PCR وهي العزلات Ap1 و Ap7 و Ap14 وارسلت الى مركز الجينوم/ كلية العلوم والصحة/ جامعة كويا لإجراء عملية الـ Sequencing عليها. حيث تم الحصول على تسلسلات من القواعد النايروجينية لعينات الـ DNA.

ادخلت هذه التسلسلات في برنامج تحليل DNA BLAST عن طريق الرابط الالكتروني:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> لإجراء التحليل لهذه التسلسلات وبيان مدى تقاربها مع التسلسلات الموجودة والمسجلة في بنك الجينات Gene Bank اذ اظهرت نتائج التحليل وجود تشابه كبير بنسبة 98% بين تسلسلات العزلة Ap1 وتسلسلات العزلة الفطرية *Aureobasidium pullulans* المسجلة في بنك الجينات بالرقم KC253972.1 (الشكل 4 و 5).



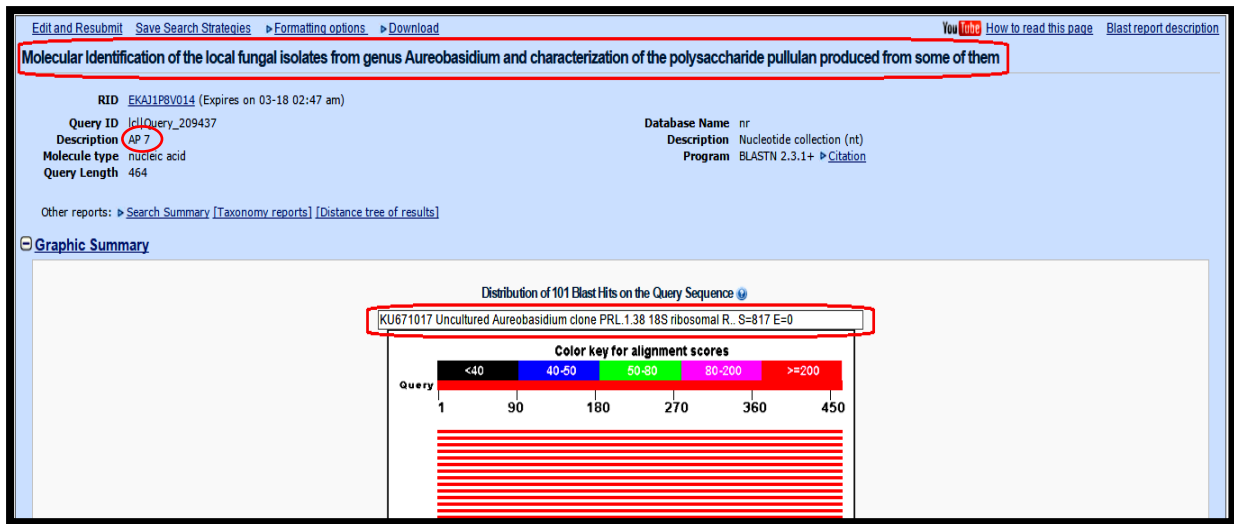
الشكل 4: برنامج التحليل لتسلسلات القواعد النايروجينية للعزلة الفطرية المحلية Ap1 DNA BLAST/NCBI

*Aureobasidium pullulans* strain UOA/HCPF ENV71B isolate ISHAM-ITS\_ID MITS391 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence. Sequence ID: [gb|KC253972.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/gb/KC253972.1) Length: 577 Number

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
749 bits(405)	0.0	426/435(98%)	5/435(1%)	Plus/Plus
Query 1	ATCATTAAAGAGTAAGGGTGCT	-----CCCGACCTCCAACCCCTTGTGTGTTAAAACTACCT		56
Sbjct 24	ATCATTAAAGAGTAAGGGTGCT	AGCGCCCGACCTCCAACCCCTTGTGTGTTAAAACTACCT		83
Query 57	TGTTGCTTTGGCGGGACCCGCTCGGTCTCGAGCCGCTGGGGATTCTGCCAGGCGAGCGCC			116
Sbjct 84	TGTTGCTTTGGCGGGACCCGCTCGGTCTCGAGCCGCTGGGGATTCTGCCAGGCGAGCGCC			143
Query 117	CGCCAGAGTTAAACCAAACCTTTGTTATTTAAACCGGTCGTC	CAGTTAAAAATTTGAATT		176
Sbjct 144	CGCCAGAGTTAAACCAAACCTTTGTTATTTAAACCGGTCGTC	CAGTTAAAAATTTGAAT		202
Query 177	AAATCAAAAACCTTCAACAAGGATCTCTTGGTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA			236
Sbjct 203	AAATCAAAAACCTTCAACAAGGATCTCTTGGTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA			262
Query 237	TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG			296
Sbjct 263	TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG			322
Query 297	CGCCCTTGGTATTCGAGGGGATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCTATG			356
Sbjct 323	CGCCCTTGGTATTCGAGGGGATGCCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCTATG			382
Query 357	CTTGGTATTGGGCGTCGTCCTT	TGTTGGGCGCCCTTAAAGACCTCGGCGAGGGCCACTCC		416
Sbjct 383	CTTGGTATTGGGCGTCGTCCTT	TGTTGGGCGCCCTTAAAGACCTCGGCGAGGGCCACTCC		442
Query 417	GGCTTTAGGCGTAGT	431		
Sbjct 443	GGCTTTAGGCGTAGT	457		

الشكل 5: مقارنة تسلسلات القواعد النايروجينية بين العزلة المحلية Ap1 والسلالة القياسية المسجلة بالرقم [gb|KC253972.1|](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/KC253972.1)

كما أظهرت نتائج التحليل باستخدام برنامج DNA BLAST وجود تشابهاً بنسبة 98% بين تسلسلات العزلة AP 7 مع تسلسلات السلالة الفطرية *Aureobasidium* والمسجلة في بنك الجينات بالرقم [KU671017.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/KU671017.1) إذ كانت اغلب التسلسلات متشابهة الى حد كبير (الشكل 6 و7).



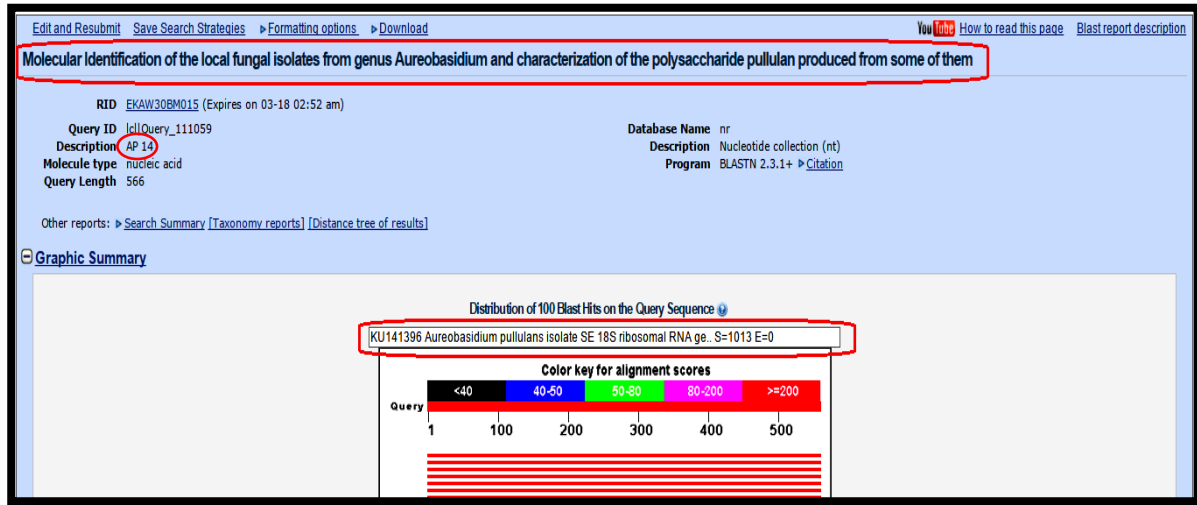
الشكل 6: نتائج برنامج التحليل لتسلسلات القواعد النايروجينية للعزلة الفطرية المحلية AP7 DNA BLAST/NCBI *Uncultured Aureobasidium clone PRL.1.38 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence* [GenBank: KU671017.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/KU671017.1) Length: 542 Number



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
817 bits(442)	0.0	460/468(98%)	4/468(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATCATTAAAGAGTAAGGGTGCTCAGCGCCCGACCTCCAACCCTTTGTGTTAAAACCTACC	60		
Sbjct 5	ATCATTAAAGAGTAAGGGTGCTCAGCGCCCGACCTCCAACCCTTTGTGTTAAAACCTACC	64		
Query 61	TTGTTGCTTTGGCGGGACCGCTCGGACTCGAGCCGCTGGGGATTCTGCCAGGGCGAGCGG	120		
Sbjct 65	TTGTTGCTTTGGCGGGACCGCTCGGACTCGAGCCGCTGGGGATTCTGCCAGGGCGAGCGC	124		
Query 121	GCGCCAGAGTTAAACCAAACCTTTGTTATTTAACCGGTCGTCGAGTTAAAATTTTGAAT	180		
Sbjct 125	CCGCCAGAGTTAAACCAAACCTTTGTTATTTAACCGGTCGTCGAGTTAAAATTTTGAAT	184		
Query 181	AAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA	240		
Sbjct 185	AAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA	244		
Query 241	TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG	300		
Sbjct 245	TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTG	304		
Query 301	CGCCCTTGG---CGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCTATG	356		
Sbjct 305	CGCCCTTGGATTTCGAGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCTATG	364		
Query 357	CTTGGTATTGGGTGCCGTCTTAGTTGGGCGCGCCTTAAAGACCTCGGCGAGGGCCTCACC	416		
Sbjct 365	CTTGGTATTGGGTGCCGTCTTAGTTGGGCGCGCCTTAAAGACCTCGGCGAGGGCCTCACC	424		
Query 417	GGCTTTAGGCGTAGTAGAATTTATTCGAACGTCGTCAAAGGAGAGGA	464		
Sbjct 425	GGCTTTAGGCGTAGTAGAATTTATTCGAACGTCGTCAAAGGAGAGGA	472		

الشكل 7: مقارنة تسلسلات القواعد النايروجينية بين العزلة المحلية Ap7 والسلالة القياسية المسجلة بالرقم KU671017.1

كذلك أظهرت نتائج التحليل باستخدام برنامج DNA BLAST وجود تشابهاً بنسبة 99% (الجدول 1) بين تسلسلات العزلة Ap14 وتسلسلات السلالة *A. pullulans* والمسجلة في بنك الجينات بالرقم KU141396.1 (الشكل 8 و9).



الشكل 8: نتائج برنامج تحليل تسلسلات القواعد النايروجينية للعزلة الفطرية المحلية Ap14

*Aureobasidium pullulans* isolate SE 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence **GenBank: KU141396.1** Length: 600 Number

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1013 bits(548)	0.0	560/566(99%)	0/566(0%)	Plus/Plus
Query 1	TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAGTAAAGGGTCTCAGCG	60		
Sbjct 19	TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAGTAAAGGGTCTCAGCG	78		
Query 61	CCCGACCTCCAACCCCTTTGTTGTTAAAACTACCTTGTGCTTTGGCGGGACGCTCC	120		
Sbjct 79	CCCGACCTCCAACCCCTTTGTTGTTAAAACTACCTTGTGCTTTGGCGGGACGCTCC	138		
Query 121	TCGAGCCGCTGGGGATCGTCCAGGGCGAGCGCCCGCCAGAGTTAAACCAAACCTTTGTT	180		
Sbjct 139	TCGAGCCGCTGGGGATCGTCCAGGGCGAGCGCCCGCCAGAGTTAAACCAAACCTTTGTT	198		
Query 181	ATTTAAACCGTCTGAGTTAAAAATTTTGAATAAATCAAAAATTTCAACAACGGATCTC	240		
Sbjct 199	ATTTAAACCGTCTGAGTTAAAAATTTTGAATAAATCAAAAATTTCAACAACGGATCTC	258		
Query 241	TTGGTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAT	300		
Sbjct 259	TTGGTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAT	318		
Query 301	TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGC	360		
Sbjct 319	TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGC	378		
Query 361	CTGTTGAGCGTCAATACACCACTCAAGCTATGCTTGGTATTGGGCCTGCTCTTAGTTG	420		
Sbjct 379	CTGTTGAGCGTCAATACACCACTCAAGCTATGCTTGGTATTGGGCCTGCTCTTAGTTG	438		
Query 421	GGCGCCCTTAAAGACCTCGGGCAGGGCCACTCCGGCTTTAGGCGTAGTAGAATTTATTCG	480		
Sbjct 439	GGCGCCCTTAAAGACCTCGGGCAGGGCCACTCCGGCTTTAGGCGTAGTAGAATTTATTCG	498		
Query 481	AACGTCTGTCAAAGGAGAGGAACTCTGCCGACTGAAAACCTTTATTTTTCTAGGTTGACCT	540		
Sbjct 499	AACGTCTGTCAAAGGAGAGGAACTCTGCCGACTGAAAACCTTTATTTTTCTAGGTTGACCT	558		
Query 541	CGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA	566		
Sbjct 559	CGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA	584		

الشكل 9: مقارنة تسلسلات القواعد النايروجينية بين العزلة الفطرية المحلية Ap14 والسلالة القياسية المسجلة بالرقم KU141396.1

كما لوحظ من نتائج التحليل اختلاف في بعض القواعد النايروجينية بين العزلات المحلية والسلالات القياسية المشابهة لها من بنك الجينات في بعض المواقع عند مقارنة التسلسلات العائدة للعزلات المحلية وتلك القياسية، وهذا الاختلاف يمثل طفرات نقطية Point Mutations حدثت على مستوى تسلسلات الـ DNA للعزلات الفطرية والتي تشمل استبدال قاعدة باخرى في تسلسل القواعد النايروجينية، او حذف قاعدة من التسلسل، او اضافة قاعدة الى التسلسل. ان طفرات الاستبدال التي حدثت هي طفرات انتقال Transition Mutations، اي ان الاستبدال يتضمن احلال قاعدة نايتروجينية بأخرى من مجموعة البيورينات او البيريميديئات نفسها. علما ان هذه الطفرات قد حدثت تلقائياً (الجدول 2).

الجدول 1: العزلات المشخصة لفطر *Aureobasidium* بالاعتماد على التسلسلات الموجودة في بنك الجينات

العزلات	عدد القواعد النايروجينية	نسبة التشابه	رقم السلالات القياسية المحددة من Gene Bank
Ap1	431	%98	<i>A. pullulans</i> KC253972.1
Ap7	464	%98	<i>Aureobasidium</i> KU671017.1
Ap14	566	%99	<i>A. pullulans</i> KU141396.1

الجدول 2: التباين في مواقع القواعد النايبروجينية بين العزلات المحلية والسلالة القياسية المشابهة من بنك الجينات

موقع تسلسل القاعدة النايبروجينية	القواعد النتروجينية للعزلات قيد الدراسة والمطابقة لها		السلالة القياسية المطابقة لها في بنك الجينات	العزلة المحلية
	السلالة القياسية	العزلة المحلية		
23	A	-	<i>A.pullulans</i> KC53972.1	Ap1
24	G	-		
25	C	-		
26	G	-		
159	G	C		
175	-	T		
196	C	G		
379	A	T		
386	C	G		
86	T	A		
121	C	G		
188	A	C		
312	A	-		
313	T	-		
314	T	-		
315	C	-	<i>A.pullulans</i> KU141396.1	Ap14
111	C	G		
117	G	C		
118	G	C		
136	T	A		
407	G	C		

وأدخلت تسلسلات القواعد النيتروجينية التي حصل عليها من تقانة الـ Sequencing في برنامج MoleBlast بواسطة الرابط الإلكتروني: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/moleblast/moleblast.cgi> ؛ للحصول على مخطط شجري للنمط الوراثي يوضح العلاقة بين العزلات الفطرية قيد الدراسة والسلالات الموجودة والمسجلة في بنك الجينات (الشكل 10).

وفي ضوء المخطط الشجري للنمط الوراثي Phylogenetic Tree (الشكل 10) لوحظ ان العزلة الفطرية المحلية Ap1 كانت قريبة الى السلالة الفطرية القياسية المسجلة في بنك الجينات *Aureobasidium pullulans* gb/KC253972.1 وقريبة من السلالة القياسية *A.pullulans* gb/AJ244233.1 وكذلك مقارنة للسلالة القياسية *A.pullulans* gb/FJ150907.1 . أما العزلة الفطرية المحلية Ap7 فقد ظهرت أقرب إلى السلالة القياسية *Aureobasidium* gb/KU671015.1 من غيرها وقريبة من السلالة القياسية *Aureobasidium* gb/KU671017.1 وقريبة من السلالة القياسية *A.pullulans* var. *melanogenum* *A.pullulans* gb/KT454783.1 والسلالة القياسية *Aureobasidium* gb/KU671016.1 وكذلك مقارنة للسلالة *A.pullulans* gb/KT352842.1. كما لوحظ أن العزلة الفطرية المحلية Ap 14 كانت اقرب إلى السلالة *A.pullulans* gb/KU141396.1 من غيرها وقريبة من السلالة *Ascomycota* sp. gb/KP698350.1.



الشكل 10: المخطط الشجري للنمط الوراثي لنتائج تحليل تسلسل القواعد النروجينية لثلاثة عزلات محلية باستخدام Mole-Blast

هذه النتائج تبين ان العزلات الفطرية المحلية تعود إلى الفطر *A. pullulans* وهذا ما يؤكد ويعزز النتائج التي تم الحصول عليها من تقانة التفاعل التضاعفي المتخصص ويثبت صحة نتائج التشخيص التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة. وتتفق هذه النتائج مع كثير من البحوث والدراسات، حيث استخدم الباحث (Prasongsuk *et al.*, 2005) تقانة Sequencing لتشخيص عزلات الفطر *A. pullulans* المعزولة من اوراق اشجار المانجا ومن اسطح الحمامات في مناطق مختلفة من تايلند واطهرت نتائج الـ DNA Sequencing لمنطقة ITS rDNA تشابها كبيرا بنسبة 95% مع سلالة الـ *A. pullulans* القياسية الموجودة في بنك الجينات.

كما استخدم الباحث (Mirzwa-Mrów *et al.*, 2014) تقانة الـ DNA Sequencing في تشخيص 16 عزلة محلية من عزلات الفطر *A. pullulans* المعزولة من اشجار التفاح والعرموط المسببة لمرض التبقع الاسود، حيث تم الحصول على 300 عزلة قسمت على مجاميع، واخذت 16 عزلة من المجموعة الاولى واجريت عليها عملية التفاعل التضاعفي المتخصص Specific PCR، وواحدة من نواتج التفاعل التضاعفي أجريت عليها عملية الـ Sequencing لمنطقة ITS rDNA ومقارنتها مع السلالات الموجودة في بنك الجينات واطهرت نتائج التحليل شبيها لـ *A. pullulans* بنسبة 100% وتم مقارنة بقية العزلات مع هذه العزلة بالاعتماد على الصفات المظهرية.

وتمكن (Arzanlou 2014) من تشخيص 14 عزلة من الفطر *Aureobasidium* المعزولة من الانسجة الوعائية لاشجار التفاح من شرق وغرب أذربيجان قرب ايران باستخدام تقانة الـ DNA Sequencing وبوساطة برنامج DNA Blast/NCBI من خلال مقارنتها بالسلالات الموجودة في بنك الجينات اظهرت انها تعود لـ *A. pullulans*. وفي ضوء المخطط الشجري للنمط المظهري يتضح تجمع العزلات المحلية مع مثيلاتها الموجودة في بنك الجينات في ثلاثة مجاميع رئيسية، اذ ولوحظ ان العزلات المحلية كانت منضوية تحت السلالة *A. pullulans var. pullulans*.

وأوضح (Dovana *et al.*, 2015) إمكانية إيجاد التباين الوراثي للعزلات الفطرية باستخدام تقانة الـ DNA Sequencing. حيث تم عزل 19 عزلة من سيقان وجذور النباتات المائية كـ *Mentha aquatica* ودرست خصائصها المظهرية والنمو واجريت عملية الـ DNA Sequencing على منطقة ITS rDNA لإيجاد التباين الوراثي لـ 17 عزلة. وظهرت النتائج ان تسعة عزلات محلية كانت متشابهة بنسبة 100% مع السلالات الموجودة في بنك الجينات كالاتي: العزلة SE تطابق السلالة *A.pullulans*. والعزلتين SA و SL تطابق *Cadophora luteoolivacea* و ST2 تطابق *Cladosporium halotolerans* و SL23 تطابق *Penicillium destructivum* اما العزلة RT6c فكانت مطابقة لـ *Nemania serpens* و RL3 مطابقة لـ *Penicillium resedanum* وكانت RT5 تطابق الـ *Penicillium solitum* و SS تطابق *Sarocladium strictum*. وأرسلت نتائج التحليل هذه الى بنك الجينات باستخدام الموقع الالكتروني في الـ NCBI وادخلت في بنك الجينات كعزلة قياسية واعطيت رقماً ورمزاً خاصاً بها في بنك الجينات كالاتي: Ap7.sqn Ap7:، Ap1.sqn Ap1 KX964610، Ap14.sqn Ap14 KX964612، KX964611 وهذا يؤكد صحة النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة وصحة تشخيص العزلات المحلية قيد الدراسة.

#### المصادر

- Alam, N.; Shim, M.J.; Lee, M.W.; Shin, P.G.; Yoo, Y.B.; Lee, T.S. (2009). Phylogenetic relationship in different commercial strains of *Pleurotus nebrodensis* based on ITS Sequence and RAPD. *Mycobiol.* **37** (3), 183-188.
- Arzanlou, M. (2014). Molecular characterization of *Aureobasidium* species in Iran. *Res. Mol. Med.* **2**(2), 28-33.
- Dovana, F.; Mucciarelli, M.; Mascarello, M.; Fusconi, A. (2015). In vitro morphogenesis of *Arabidopsis* to search for novel endophytic fungi modulating plant growth. *Plos One. J. Pone.* **10**(12), 1-18.
- Dunber, J.; Ticknor, L.O.; Kuske, C.R. (2001). Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(1), 190-197.
- Edwardes, I.P.; Turco, R.F. (2005). Inter-and intraspecific resolution of nrDNA TRFLP assessed by computer-simulated restriction analysis of a diverse collection of ectomycorrhizal Fungi. *Mycol. Res.* **109**(2), 212-226.
- Ganeshamoorthi, P.; Dubey, S.C. (2013). Anastomosis grouping and genetic diversity analysis of *Rhizoctonia solani* isolates causing wet root rot in chickpea. *African J. Biotechnol.* **12**(43), 6159-6169.
- Gaur, R.; Singh, R. (2010). Optimization of physico- Chemical and Nutritional parameters for pullulan production by amutant of Thermotolerant *Aureobasidium pullulans* in Fed batch Fermentation process. *African J. Biotechnol.* **9**(43), 7322-7330.
- Hammo, B.Y. (2013). Diagnostic and molecular genetic study for yeast of genus *Saccharomyces* isolated from different sources in Mosul City. Ph. D. Thesis. Col. Edu. Un. Mousl. Iraq.
- Hawkes, M.; Rennie, R.; Sand, C.; Vaudry, W. (2005). *Aureobasidium pullulans* infection: Fungemia in an infant and a review of human cases. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, **51**, 209-213.
- Leathers, T.D. (2003). Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 468-473.
- Manitchotpisit, P.; Price, N.P.J.; Leathers, T.D.; Punnapayak, H. (2011). Heavy oils produced by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol. Lett.* **33**, 1151-1157.
- Martini, M.; Musetti, R.; Grisan, S.; Polizzotto, R.; Borselli, S.; Pavan, F.; Osler, R. (2009). DNA-Dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Dis.* **93**(10), 993-998.

- Mirzwa-Mróz, E.; Winska-Krysiak, M.; Dziciol, R.; Miękus, A. (2014). Characteristics of *Aureobasidium pullulans* (de Bary et Löwenthal G. Arnaud isolated from apples and pears with symptoms of sooty blotch in Poland. *Acta. Sci. Pol., Hortorum Cultus.* **13**(3),13-22.
- Ono, K.; Yasuha, N.; Ueda, S. (1977). Effect of pH on pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* S. I. *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2113-2118.
- Paoletta, P. (1998). "Introduction to Molecular Biology". The McGraw-Hill Companies. Inc. U.S.A. 60-62.
- Perez, R.I.; Chacón, J.; Fidalgo, A.; Martin, J.; Paraiso, V.; Muñoz-Bellido, J.L. (1997). Peritonitis by *Aureobasidium pullulans* in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*, **12**, 1544-1545.
- Pollock, T.J.; Thorne, L.; Armentrout, W.R. (1992). Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high-molecular- weight pullulans with reduced pigmentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 877-883.
- Prasongsuk, S.; Sullivan, R.F.; Kuhirun, M.; Eveleigh, D.E.; Punnapayak, H. (2005). Thailand habitats as sources of pullulan- producing strains of *Aureobasidium pullulans*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 393-398.
- Punnapayak, H.; Sudhadham, M.; Prasongsuk, S.; Pichayangkura, S. (2003). Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in thailand. *J. Indu. Microbiol. and Biotechnol.*, **30**, 89-94.
- Ray, M.J.; Dickinson, D.J.; Buck, M. (2004). *Aureobasidium* or *Hormonema* A Genetic Approach. The Inter. Res. Group on Wood Preservation. Paper Prepared for the 35<sup>th</sup> Annual Meeting.
- Sugumaran, K. R.; Gowthami, E.; Swathi, B.; Elakkiya, S.; Sirvastava, S.N.; Raavikumar, R.; Gowdhaman, D.; Ponnusami, V. (2013). Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian Palm. *Kemel: Anovel Substrate. Carbohydr Polymer.* **92**, 697-703.
- White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J.W. (1990). "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Apple". Academ. Press. Inc., New York. pp. 315-322.
- Wu, S.; Chen, J.; Pan, S. (2012). Optimization of fermentation conditions for the production of pullulan by a new strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud and its characterization. *Carbohydr.Polymer.* **87**, 1696-1700.
- Yurlova, N.A.; de Hoog, G.S. (1997). A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie. Van. Leeuwenhoek.* **72**,141-147.