



## التشخيص الجزيئي لعدة عزلات محلية من الفطر *Aureobasidium pullulans* منتجة للسكر المتعدد البولوليولان

شمال يونس عبدالهادي<sup>1</sup> و أسوان حمد الله العاني<sup>2\*</sup> و فوز عبدالسلام خليل<sup>3</sup>  
<sup>1</sup> و <sup>3</sup> كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة / جامعة الموصل و <sup>2</sup> كلية الزراعة / قسم علوم الأغذية / جامعة بغداد / العراق.

\*Corresponding author: [aswanbayar@yahoo.com](mailto:aswanbayar@yahoo.com)

### الخلاصة

تم عزل 7 عزلات محلية من جنس *Aureobasidium* من سطح أوراق سليمة للاشجار ( التفاح والعرموط والخوخ) شخّصت العزلات باستخدام الصفات المظهرية والزرعية ، أظهرت جميع العزلات والتي رمز لها ( AP1 و AP2 و AP3 و AP4 و AP5 و AP6 و AP7 ) تعددية الأشكال في المستعمرات وإنتاج صبغة الميلانين وإنتاج البولوليولان في مزارع الدوارق المهزوزة وهذا ما يؤكد أنها تعود الى النوع *A. pullulans*. بينت نتائج التشخيص الجزيئي عند الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز للحامض النووي المستخلص من العزلات المحلية بعد تضخيمه بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل وباستعمال بادئات متخصصة إنفصال حزمة واحدة لكل عذلة وبوزن جزيئي 600 زوج قاعدي . كما اعطى تتابع القواعد النروجينية لجميع العزلات نسبة تطابق (99 – 100) % مع تتابع القواعد النروجينية للعزلات المودعة في بنك الجينات .

### Molecular identification of some local isolates of *Aureobasidium pullulans* produces polysaccharide the pullulan

Shimal Y. Abdul-hadi<sup>1</sup>, Aswan H. Al-Bayyar<sup>2\*</sup> and Fawz A. Al-Saffar<sup>3</sup>  
<sup>1,3</sup>Faculty of Education for Pure Science, University of Mosul and <sup>2</sup>College of Agriculture, University of Baghdad, Iraq..

\*Corresponding author: [aswanbayar@yahoo.com](mailto:aswanbayar@yahoo.com)

### Abstract

Seven local isolates of *Aureobasidium* was isolated from leaf surface of Apple, Pear and Peach trees, the isolates were identified by using morphological and cultural characterizations, all the isolates which code with (AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, AP6, AP7) showed colony polymorphism and melanin dye production and pullulan production in shaking flasks culture, this assure that they were belong to *A. pullulans*. Molecular identification results showed that there was one band for each isolate with 600 base pair when using electrophoresis on agarose gel for DNA after amplifying by PCR technique with specialized primers. The sequence of nitrogen bases for all the isolates gave consistency portion of (99-100%) according to gene bank isolate.

### المقدمة

يعد الفطر *Aureobasidium pullulans* من الفطريات الرمية التي تعود الى صنف الفطريات الكيسية وهو احد اهم الفطريات المنتجة للسكريات المتعدد المهمة صناعياً وهو البولوليولان ( 1 و 2 و 3 ) . عرف سابقا باسم *Pullularia pullulans* من قبل العالم DeBary عام 1866 ( 4 و 5 ) . وتمكن Bauer عام 1938 من إنتاج السكر المتعدد من الفطر وعزله ودراسة خواصه واطلق عليه Pullulan ( 6 ) .

يتواجد على سطح اوراق النباتات المختلفة وينمو على سقوف المنازل الرطبة وتبدو آثاره من الصبغة السوداء (الميلانين) التي تظهر على سقوف المنازل والأنسجة النباتية وهي السبب الرئيسي في تليين موضع الصابة (7) كما يمكن عزله من بقايا الأخشاب والصخور والتربة والزجاج وفي المناطق المدارية والأستوائية المتطرفة (8 و 9). يظهر الفطر اشكال مختلفة خلال دورة حياته Polymorphic والتي تظهر فوق سطح الاوساط الغذائية الصلبة حيث يتكون من خيوط فطرية وخلايا مفردة شبيهة بالخميرة كما يكون سبورات كلاميديه (10).

ينتج الفطر سكر البولولان وهو سكر متعدد خطي خارج خلوي له القابلية على الذوبان في الماء يتكون من وحدات متكررة من المالتوترايوز مرتبطة بواسطة الاصرة الكلايكوسيدية 6-1- $\alpha$  والتي تتكون من وحدات ثانوية من الكلوكوز مرتبطة مع بعضها بالاصرة 4-1- $\alpha$  وهذا التعاقب المنتظم في الاواصر يعطي الثباتية في التركيب وقابلية ذوبان عالية (11 و 12). وفي السنوات الأخيرة ازداد الأهتمام بالسكريات المتعددة الميكروبية لما لها من خصائص مفيدة وتطبيقات في مجالات مختلفة (13). يستخدم البولولان بشكل كبير في الصناعات الغذائية كمادة مغلقة وحافظة كما يستخدم بشكل واسع في المجالات الطبية في تصنيع الادوية والتثام الجروح ويستخدم بديل عن الكولسترول والاحماض الدهنية في الغذاء، كما يستخدم في صناعة الورق ومستحضرات التجميل ومنتجات العناية بالبشرة (14 و 15). من هنا جاءت هذه الدراسة من اجل الحصول على عزلات محلية من الفطر وتأكيد تشخيصها على المستوى الجزيئي باستعمال منطقة ITS كشفرة تشخيصية معتمدة دولياً وباستخدام بادئات عالمية Universal primer بعد استخلاص الحمض النووي للعزلات وتضخيم منطقة الهدف باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل، وأختبار كفاءتها في إنتاج السكر المتعدد البولولان.

#### المواد وطرق العمل

**جمع وعزل العزلات المحلية:** جمعت أوراق نباتية سليمة من أشجار (التفاح والعموط والخوخ) من منطقة الغابات في مدينة الموصل. قطعت كل على حدة الى قطع صغيرة بحدود 0.5 سم ووضعنا القطع في دوارق مخروطية حاوية على 25 مل من الماء المقطر وتركت في الحاضنة لمدة 3 ايام، بعدها أخذنا 0.5 مل من نقيع كل نوع من الاوراق الى دوارق مخروطية تحتوي على 50 مل من الوسط الملحي الأدنى الذي يتكون من المواد التالية (غم/ لتر من الماء المقطر):  $(NH_4)_2HPO_4$  1 غم، NaCl 0.5 غم،  $K_2HPO_4$  2 غم،  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 غم،  $FeSO_4$  0.01 غم،  $MnSO_4$  0.01 غم، سكروز 10 غم و 10 ملغم كلوروفينكول. ضبطت الاس الهيدروجيني عند 4 (16). وزع الوسط في دوارق مخروطية سعة 250 مل بواقع 50 مل | دورق حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة بمعدل رج (150 دورة / دقيقة) لمدة يومين، بعد ذلك تركت الدوارق لتستقر لمدة 20 دقيقة ثم اخذنا 20 مايكروليتر من الجزء العلوي الرائق الغني بالخلايا ونشر في اطباق بتري تحتوي نفس الوسط اعلاه بعد اضافة 2% اكار. حضنت الاطباق في الحاضنة عند درجة حرارة 27 °م لمدة 4 ايام. بعد ذلك عزلت المستعمرات النامية ونقيت وأختبرت المستعمرات النقية من الفطر A. pullulans ذات اللون الاسود لغرض التأكد من إنتاجها للسكر المتعدد البولولان. حفظت الفطريات المنقاة في مزارع مائلة على وسط مستخلص البطاطا والسكروز عند درجة حرارة 4 °م وتم تجديد المزارع كل اسبوعين.

**وسط إنتاج البولولان والظروف الزراعية:** استخدم الوسط القياسي (17) كوسط لتحضير لقاح الفطر وإنتاج سكر البولولان يتكون الوسط مما يأتي غم / لتر: 50 سكروز،  $K_2HPO_4$  1، NaCl 0.5،  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2.5 ومستخلص الخميرة. ضبطت الاس الهيدروجيني عند 6.5. حضر لقاح الفطر بأخذ جزء

من المستعمرة الفطرية النامية على وسط PDS بعمر اسبوع الى دورق مخروطي حاو على 50 مل من الوسط القياسي ، حضنت الدوارق لمدة 5 ايام في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 27°م وبمعدل رج 150 دورة / دقيقة . لتحديد إنتاجية البوليولان حضر الوسط القياسي كما في اعلاه ووزع بمقدار 50 مل / دورق ، عقت الدوارق عند ضغط 1 كغم /سم<sup>3</sup> عند درجة حرارة 121 سيليزية لمدة 20 دقيقة . بعد التعقيم تركت الدوارق لتبرد ولقحت بلفاح الفطر 2% حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة لمد 5 ايام .

**طرائق التحليل :** تقدير الكتلة الحيوية : بعد انتهاء فترة التحضين سحبت الدوارق من الحاضنة وتم قياس الاس الهيدروجيني النهائي لكل دورق بعدها اجريت عملية نبذ مركزي عند 9000 دورة \ دقيقة لمدة 30 دقيقة بعد الترسيب ترك الرائق جانبا ، جمعت خلايا الفطر في اطباق زجاجية معلومة الوزن ووضعت في فرن كهربائي عند درجة حرارة 60 °م لمدة 24 ساعة ، وزنت الاطباق مع الخلايا بميزان حساس وقيست الكتلة الحيوية بفارق الوزنين .

**عزل وتقدير السكر المتعدد :** أخذ 10 مل من رائق المزرعة الخالي من خلايا الفطر واضيف إليه حجامان اي 20 مل من الاسيتون وحرك المزيج بقوة لترسيب السكر المتعدد ، اجريت عملية النبذ المركزي بمعدل 9000 دورة \ دقيقة لمدة 10 دقائق . فصل الرائق وجمع السكر المتعدد في أطباق زجاجية معلومة الوزن وجففت في فرن كهربائي عند درجة حرارة 60 °م لمدة 24 ساعة ، حسب السكر المتعدد بفارق الوزنين .

**التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية :** أستخلاص الحمض النووي : استخلص الحمض النووي من خلايا العزلات الفطرية باستعمال عدة الأستخلاص المجهزة من شركة Bioneer وأعتمادا على تعليمات الشركة المصنعة والتي تضمنت مجموعة من المحاليل فضلا عن اعمدة تنقية الحمض النووي Filter column وأنابيب الجمع Collection tube .

**الترحيل الكهربائي:** حضر هلام الاكاروز بتركيز (1.4)% في محلول TBE بقوة 1x والذي تكون من (40 ملي مولار من Tris، 20 ملي مولار حامض البوريك و1 مولر EDTA) باستخدام Microwave حتى الغليان ثم ترك ليبرد عند درجة حرارة (50-60)°م، ثم صب الهلام في القالب Tray الخاص بجهاز الترحيل بعد تثبيت المشط (Comb) الخاص بتكوين الحفر (Wells) مع تجنب تكوين الفقاعات . ترك الهلام ليتصلب بعدها رفع المشط ووضع الهلام في حوض الترحيل الكهربائي ثم سكب محلول TBE بحيث يغمر الهلام داخل المحلول . حضرت عينات الترحيل بمزج (5) مايكروليتر من عينات الـ gDNA مع (5-7) مايكروليتر من محلول صبغة التحميل Loading Buffer وحملت في حفر الهلام وكذلك الدليل الحجمي (Bioneer, 100bp DNA). ربط حوض الترحيل بجهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis. تم تشغيله بفرق جهد (70) فولت/سم بحيث يكون اتجاه الترحيل من القطب السالب إلى القطب الموجب وترك الى حين وصول العينات إلى قبل نهاية الهلام. بعد انتهاء العملية والتي تستغرق بحدود (2.5-3) ساعات رفع الهلام ووضع في حوض يحتوي على صبغة الايثيديوم برومايد Ethidium Bromide (0.5 ميكروغرام/مل) لمدة (30) دقيقة بعدها نقل الهلام إلى حوض فيه ماء مقطر لإزالة الصبغة الزائدة. ثم فحص الهلام باستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية في غرفة مظلمة لإظهار حزم الـ DNA (18).

**تفاعل البلمرة المتسلسل لـ DNA: Polymerase Chain Reaction of DNA :** لتأكيد تشخيص العزلات الفطرية على مستوى النوع، أجري تفاعل البلمرة لسلسلة الـ DNA بعد استخلاصه وتنقيته باستخدام

بادئات (Primers) متخصصة (Forward) ITS5 ذو التسابع ( ITS4(Revirse) ذو التسابع ( GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG ( TCCTCCGCTTATTGATATGC ) . تم التفاعل بأخذ (5) مايكروليتر من الـ DNA وأضيف إليه (5) مايكروليتر من PCR Reaction Buffer (10x) بتركيز (10) مولاري (والذي يتكون من MgCL<sub>2</sub> بتركيز (15) مل مول) و (1) مايكروليتر من dNTP (dGTP , dCTP , dATP , dTTP) و (10) ملي مول. و (0.5) مايكروليتر من TaqDNA Polymerase و (5) مايكروليتر من كل البادئات ITS5 و ITS4 و (28.5) مايكروليتر من الماء المقطر المعقم. وضع مزيج التفاعل الذي كان بحجم (50) مايكروليتر في أنبوبة ابندروق ذي حجم (0.5) مل ( 19 ) .

**الجدول (1): وضع الأنابيب في جهاز المبلر الحراري، وبرمج الجهاز**

التسلسل	المرحلة	درجة الحرارة	الوقت	عدد الدورات
1	المسخ الولي للـ DNA	95 °م	3 دقيقة	دورة واحدة
2	مسخ الـ DNA	94 °م	1 دقيقة	35 دورة
3	الالتحام	56 °م	1 دقيقة	
4	الاستطالة	72 °م	45 ثانية	
5	الاستطالة النهائية	72 °م	5 دقيقة	دورة واحدة

بعد إجراء عملية الترحيل الكهربائي، أجري استخلاص لحزم الـ DNA باستخدام العدة GEL/PCR (Purification Kit) المجهز من شركة Favor Gen الكورية . أستخدم مشرط معقم لقطع حزم الـ DNA وضعت الحزم في أنابيب ابندرف، وتمت عملية الاستخلاص بحسب ما ورد ذكره بالمصدر (20) .  
 إيجاد تسلسل القواعد النيروجينية للـ DNA: هُيئت العينات لمعرفة تسلسل القواعد النيروجينية وذلك بإضافة احد البادئات المستخدمة في تفاعل الـ PCR إلى الـ DNA وبحجم تفاعل نهائي (12) مايكروليتر كما في الجدول (2) وأرسلت الى شركة Macrogen لمعرفة تسلسل القواعد النيروجينية، وبعد وصول النتيجة أدخلت التسلسلات في الموقع العالمي لمعلومات التقنيات الأحيائية عن طريق الرابط الإلكتروني ( <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi> ) لتصنيف العزلات بالاعتماد على التسلسل الخاص بالـ DNA لكل عزلة وتحديد التسلسلات الموجودة ضمن بنك الجينات والمشابهة للتسلسلات قيد الدراسة ( 21 ) .

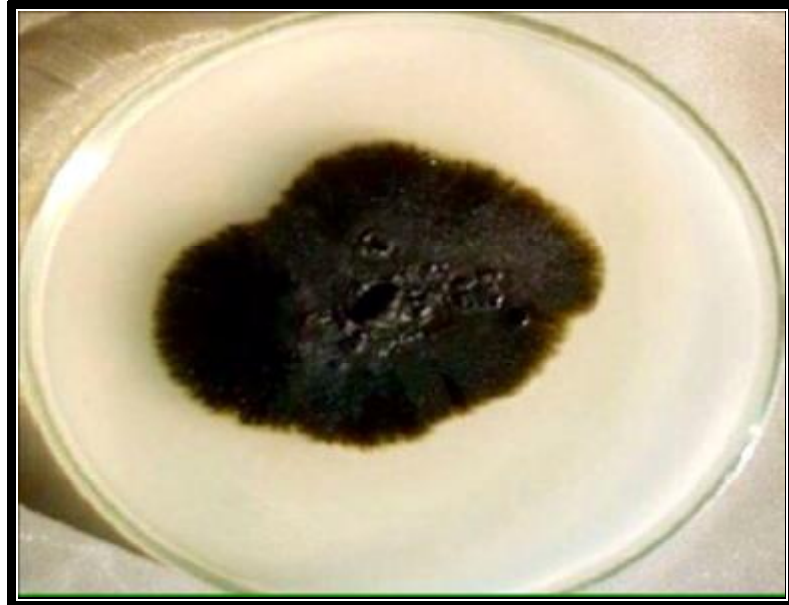
**الجدول (2) : مكونات تفاعل إيجاد تتابع القواعد النيروجينية**

المكونات	الحجم بالمايكروليتر
حزمة DNA المستخلصة من هلام الأكاروز	2
الباديء الأمامي	1
ماء	9

### النتائج والمناقشة

**تشخيص العزلات المحلية :** أجريت العديد من الفحوصات المزرعية والمورفولوجية للعزلات المحلية لتشخيصها على مستوى الجنس والنوع . وحري بالأشارة أن العدد الفعلي للعزلات التي تم الحصول عليها من مصادر العزل المختلفة يفوق العدد المذكور للعزلات المستخدمة بكثير ، إذ استبعدت العزلات التي لا تعطي مستعمرات باللون الأسود والطبيعة اللزجة وهي صفة من الصفات الأساسية التي يشترط توافرها في العزلات

المنتجة للسكر المتعدد البوليولان التابعة لجنس *Aureobasidium* ولأختزال الوقت ، لذلك أتخذت هذه الصفة عاملا أساسيا لأنتخاب العزلات منذ لحظة الشروع بالعزل والتنقية . وأشارت المراحل الأولى من العزل والتشخيص عائلية العزلات التي تم عزلها إلى جنس *Aureobasidium* ، ويوضح الشكل ( 1 ) ظهور مستعمرات جلدية القوام تميزت باللون الأسود نتيجة لأفرازها صبغة الميلانين ذات سطوح مرتفعة عالية اللزوجة . وبينت الفحوصات المجهرية أملاك العزلات خاصية تعددية الأشكال إذ ظهر فيها الطور الخميري وحيد الخلية والطور الخيطي المتعدد الخلايا وطور السبورات الكلاميدية . وعلى هذا الساس شخصت العزلات المستحصل عليها على أنها *A. pullulans* وأعتما داً على المفاتيح التصنيفية الواردة في المرجع العلمي ( 22 ) واستخدمت الرموز لتميزها عن بعضها ( *A. pullulans* Ap1 و *A. pullulans* Ap2 و *A. pullulans* Ap3 و *A. pullulans* Ap4 و *A. pullulans* Ap5 و *A. pullulans* Ap6 و *A. pullulans* Ap7 ) . وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره ( 23 ) عندما تمكن من عزل 7 عزلات من السقوف والاوراق المصابة وأظهرت تعددية الأشكال . وتتفق أيضا مع ما توصل إليه ( 24 ) عندما تم عزل وتشخيص 77 عزلة من ثمار التفاح والعرموط المصابة وبينت نتائج الفحوصات الزرعوية والمجهرية أنها تعود للفطر *A. pullulans* . وكذلك تتفق مع ما توصل إليه ( 25 ) عندما تمكن من عزل وتشخيص الفطر *A. pullulans* باستخدام الأختبارات الزرعوية والمورفولوجية .



الشكل ( 1 ) مستعمرة الفطر *A. pullulans* بعمر خمسة ايام على وسط PDS

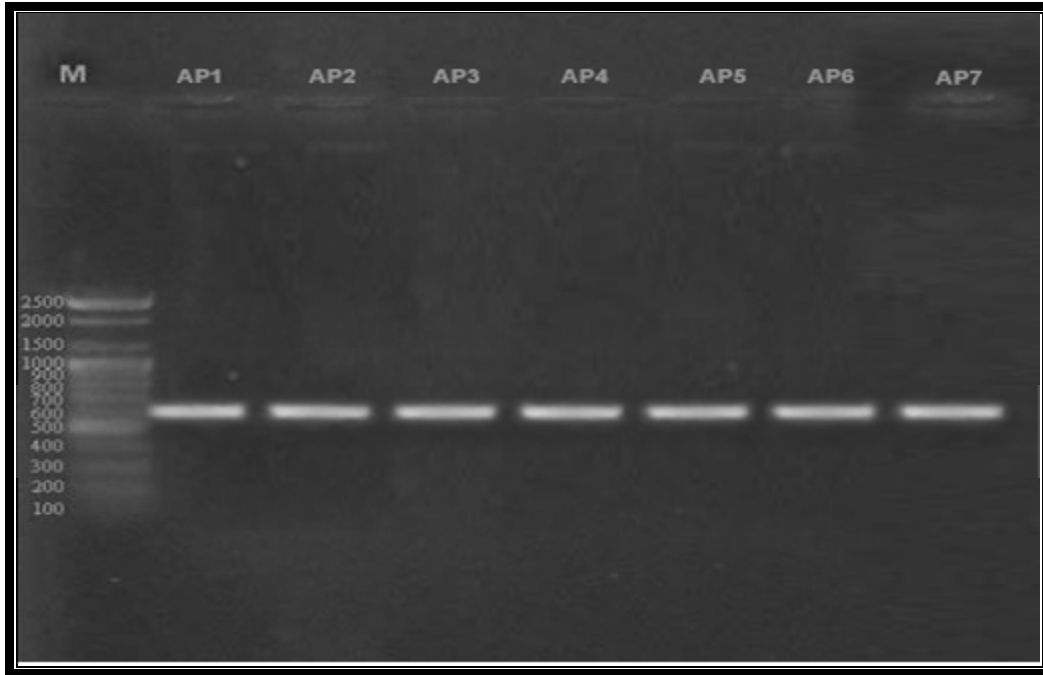
إنتاج السكر المتعدد البوليولان : نميت العزلات الفطرية التي تم تشخيصها من التجربة السابقة على وسط الأنتاج لمدة خمسة ايام من التحضين . ويلاحظ من الجدول ( 3 ) تباين العزلات المستحصل عليها في إنتاج السكر المتعدد البوليولان تبايناً واضحاً مع تميز العزلة المرقمة *A. pullulans* Ap3 إذ بلغت كمية السكر المنتج ( 21.95 ) غم \ لتر . وأعطت العزلات المشخصة مسبقا والتي رمز لها *A. pullulans* Ap1 و *A. pullulans* Ap2 و *A. pullulans* Ap6 إنتاجا من السكر المتعدد البوليولان بلغ ( 18.44 ) و ( 15.82 ) و ( 13.75 ) غم \ لتر على التوالي . وتراوحت كمية السكر المنتج ما بين ( 13.68 ) و ( 10.37 ) و ( 6.46 ) غم \ لتر

العزلات *A.pullulans* Ap4 و *A.pullulans* Ap5 و *A.pullulans* Ap7 على التوالي . أما الكتلة الحيوية فقد كانت متفاوتة أيضا بين العزلات المختلفة وكان نمو العزلات على حساب إنتاجية السكر المتعدد ، إذ أن العزلات التي أعطت إنتاجية عالية من السكر أعطت كتلة حيوية قليلة والعكس صحيح . أما الأس الهيدروجيني النهائي فقد أنخفض عن الأس الهيدروجيني الأولي ولجميع العزلات ويمكن أن يعزى السبب إلى تراكم العديد من الحوامض العضوية نتيجة للعمليات الأيضية المختلفة التي تحدث في خلايا الفطر . ويمكن أن يعود الاختلاف في قابلية العزلات على إنتاج السكر المتعدد البولوليولان إلى وجود تباين وراثي فيما بينها . فمزارع الأحياء المجهرية وإن أنتمت إلى المجموعة ذاتها تتباين وراثيا في خصائص نموها وفي فعاليتها الأيضية ، ولا يعنى التباين الوراثي بالضرورة الاختلاف في البناء الوراثي لا سيما بين العزلات التي تنتمي إلى الجنس والنوع ذاتهما بل قد يكون نابعاً عن إستجابة العزلات للظروف البيئية ( 26) . ويذكر أن ( 27 ) أكد على وجود تغير في أنتاجية السكر المتعدد البولوليولان باختلاف العزلات الفطرية والظروف الزراعية . كما جاءت النتائج مطابقة لما توصل إليه ( 28 ) والذي أشار إلى اختلاف إنتاجية السكر المتعدد البولوليولان باختلاف العزلات وظروف النمو .

**الجدول ( 3 ) إنتاج السكر المتعدد البولوليولان من العزلات الفطرية المحلية**

العزلات	الكتلة الحيوية غم\ لتر	البوليولان غم   لتر	الاس الهيدروجيني النهائي
<i>A.pullulans</i> Ap1	9.72	18.44	5.29
<i>A.pullulans</i> Ap2	7.52	15.82	5.33
<i>A.pullulans</i> Ap3	11.70	21.95	5.46
<i>A.pullulans</i> Ap4	16.44	13.68	4.85
<i>A.pullulans</i> Ap5	15.36	10.37	5.50
<i>A.pullulans</i> Ap6	10.27	13.75	5.17
<i>A.pullulans</i> Ap7	18.45	6.46	4.28

**التشخيص الجزيئي:** شخّصت العزلات التابعة لجنس *Aureobasidium* بالطرائق التقليدية على وسط بطاطا والسكروز والاكار ( PDA ) وتم التأكد من صحة تشخيصها بتشخيص جزيئي لهذه العزلات للاستفادة من الطرائق التشخيصية الحديثة وذلك بتضخيم مواقع محددة في جينوم العزلات حيث أعتمدت بادئات عالمية لتضخيم منطقة الهدف ITS كمؤشر تصنيفي وراثي معتمد لدراسة التباينات الوراثية ما بين العزلات الفطرية المختلفة في هذه المنطقة . تميزت نتائج استخدام البادئات بالنجاح والدقة العالية في التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية المنتخبة وذلك لكون منطقة الهدف الأكثر طولاً مقارنة بالبادئات الأخرى لهذه المنطقة . وأظهرت نتائج التضخيم لمنطقة الهدف عند تحليل ناتج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز كما موضح في الشكل (2) أن العزلات AP1 و AP2 و AP3 و AP4 و AP5 و AP6 و AP7 ( والتي تفاعلت جينوماتها ايجابيا مع البادئات ) الأمر الذي يثبت أن هذه العزلات تعود للفطر *A.pullulans* وصحة تسلسلات البادئات المستخدمة في البحث للتشخيص بدلالة ظهور حزم من الـ DNA بإحجام جزيئية بلغت 600 زوج قاعدي ولجميع العزلات الفطرية المنتخبة مما يشير إلى التشابه الوراثي الكبير بين العزلات .



الشكل ( 2 ) نواتج تضخيم الحمض النووي للعزلات الفطرية المختلفة عند الترحيل على هلام الاكاروز . حيث يمثل M الدليل الحجمي 100bp وتمثل المسارات من AP1-AP7 نواتج تضخيم الحمض النووي للعزلات الفطرية .

اما الشكل ( 3 ) فيوضح تتابعات القواعد النيروجينية للعزلة Ap1 ، ومن خلال قاعدة البيانات data base الشاملة لتتابعات DNA المتاحة للعموم مجاناً والمزودة بحواشي من المراجع والمعلومات الحيوية المنشأة في المركز العالمي لمعلومات التقنيات الاحيائية ( NCBI ) والتي تؤمن البحث عن مناطق التماثل Identity او التشابه Similarity ما بين تتابع القواعد النيروجينية للعزلات قيد البحث وبيانات التابع في بنك الجينات Gene bank ومن ثم المقارنة بين التتابعات النيوكليوتيدية العائدة لنفس الكائنات الحية أو أحدها للاستدلال عليها وتصنيفها أخضعت التتابعات للعزلة Ap1 الى برنامج Blast حيث وجد أن تتابعات القواعد النيروجينية لها أبدت حالة تطابق تام مع تتابعات القواعد النيروجينية بنسبة 99% مع السلالة *A. pullulans* المودعة في بنك الجينات بالتسلسل CBS 100280 .

اما الشكل ( 4 ) فيوضح تتابعات القواعد النيروجينية للعزلة Ap2 والتي اظهرت نسبة تطابق 99% مع تتابعات القواعد النيروجينية للعزلة *Aureobasidium pullulans isolate F36-04* المودعة في بنك الجينات .

1	GCGGAGGAAA	AGAAACAAAC	AGGGATTGC	CCTAGTAACG	GCGAGTGAAG	CGGCAACAGC
61	TCAAATTTGA	AAGCTAGCCT	TCGGGTTTCG	ATTGTAATTT	GTAGAGGATG	ATTTGGGGAA
181	GCCGCCTGTC	TAAGTTCCTT	GGAACAGGAC	GTCATAGAGG	GTGAGAATCC	CGTATGTGAC
241	AGGAAATGGC	ACCCTATGTA	AATCTCCTTC	GACGAGTCGA	GTTGTTTGGG	AATGCAGCTC
361	TAAATGGGAG	GTAAATTTCT	TCTAAAGCTA	AATATTGGCG	AGAGACCGAT	AGCGACAAG
421	TAGAGTGATC	GAAAGATGAA	AAGCACTTTG	GAAAGAGAGT	TAAAAAGCAC	GTGAAATTGT
481	TGAAAGGGAA	GCGCTTGCAA	TCAGACTTGT	TTAAACTGTT	CGGCCGGTCT	TCTGACCGGT

الشكل ( 3 ) : تتابعات القواعد النيروجينية لعزلة الفطر AP1



كما أظهر الشكل ( 5 ) تتابع القواعد النيتروجينية للعزلة Ap3 والتي اظهرت نسبة تطابق بلغت 100% مع تتابع القواعد النيتروجينية للعزلة المودعة في بنك الجينات بالرقم *Aureobasidium pullulans isolate F36-04* . ويظهر الشكل ( 6 ) تتابع القواعد النيتروجينية للعزلة Ap4 والتي اظهرت نسبة تطابق بلغت 100% مع العزلة المرقمة *Aureobasidium pullulans isolate F36-04* الواردة في بنك الجينات . اما الشكل ( 7 ) فيبين تتابع القواعد النيتروجينية للعزلة AP5 والتي اظهرت نسبة تطابق بلغت 100% مع السلالة *Aureobasidium pullulans strain CBS 109810* المودعة في بنك الجينات ايضا . في حين يوضح الشكل ( 8 ) تتابع القواعد النيتروجينية للعزلة AP6 والتي ابدت تطابق بنسبة 99% مع السلالة *A.pullulans EXF-1668* . كما يبين الشكل ( 9 ) تتابعات القواعد النيتروجينية للعزلة AP7 والتي أعطت نسبة تطابق بلغت 99% مع تتابعات القواعد النيتروجينية للسلالة *A. pullulans F36-04* المودعة في بنك الجينات .

1	GCGGAGGAAA	AGAAACCAAC	AGGGATTGCC	CTAGTAACGG	CGAGTGAAGC	GGCAACAGCT
61	CAAATTTGAA	AGCTAGCCTT	CGGGTTCGCA	TTGTAATTTG	TAGAGGATGA	TTTGGGGAAG
181	CCGCCTGTCT	AAGTTCCTTG	GAACAGGACG	TCATAGAGGG	TGAGAATCCC	GTATGTGACA
241	GGAAATGGCA	CCCTATGTAA	ATCTCCTTCG	ACGAGTCGAG	TTGTTTGGGA	ATGCAGCTCT
361	AAATGGGAGG	TAAATTTCTT	CTAAAGCTAA	ATATTGGCGA	GAGACCGATA	GCGCACAAGT
421	AGAGTGATCG	AAAGATGAAA	AGCACTTTGG	AAAGAGAGTT	AAAAAGCACG	TGAAATTGTT
481	GAAAGGGAAG	CGCTTGCAAT	CAGACTTGTT	TAAACTGTTC	GGCCGGTCTT	CTGACCGGTT

الشكل (4) : تتابعات القواعد النيتروجينية لعزلة الفطر AP2

1	gcgaggaaa	agaaaccaac	AGGGATTGCC	CTAGTAACGG	CGAGTGAAGC	GGCAACAGCT
61	CAAATTTGAA	AGCTAGCCTT	CGGGTTCGCA	TTGTAATTTG	GTAGAGGATG	ATTTGGGGAA
181	GCCGCCTGTC	TAAGTTCCTT	GGAACAGGAC	GTCATAGAGG	TAGAGGATGA	TTTGGGGAAG
241	CCGCCTGTCT	AAGTTCCTTG	GAACAGGACG	TCATAGAGGG	TGAGAATCCC	GTATGTGACA
361	GGAAATGGCA	CCCTATGTAA	ATCTCCTTCG	ACGAGTCGAG	TTGTTTGGGA	ATGCAGCTCT
421	AAATGGGAGG	TAAATTTCTT	CTAAAGCTAA	ATATTGGCGA	GAGACCGATA	GCGCACAAGT
481	AGAGTGATCG	AAAGATGAAA	AGCACTTTGG	AAAGAGAGTT	AAAAAGCACG	TGAAATTGTT

الشكل (5) : تتابعات القواعد النيتروجينية لعزلة الفطر AP3

1	GCGGAGGAAA	AGAAACCAAC	AGGGATTGCC	CTAGTAACGG	CGAGTGAAGC	GGCAACAGCT
61	CAAATTTGAA	AGCTAGCCTT	CGGGTTCGCA	TTGTAATTTG	TAGAGGATGA	TTTGGGGAAG
181	CCGCCTGTCT	AAGTTCCTTG	GAACAGGACG	TCATAGAGGG	TGAGAATCCC	GTATGTGACA
241	GGAAATGGCA	CCCTATGTAA	ATCTCCTTCG	ACGAGTCGAG	TTGTTTGGGA	ATGCAGCTCT
361	AAATGGGAGG	TAAATTTCTT	CTAAAGCTAA	ATATTGGCGA	GAGACCGATA	GCGCACAAGT
421	AGAGTGATCG	AAAGATGAAA	AGCACTTTGG	AAAGAGAGTT	AAAAAGCACG	TGAAATTGTT
481	GAAAGGGAAG	CGCTTGCAAT	CAGACTTGTT	TAAACTGTTC	GGCCGGTCTT	CTGACCGGTT

الشكل ( 6 ) : تتابعات القواعد النيتروجينية لعزلة الفطر AP4

1	GCGGAGGAAA	AGAACCAACA	GTGATTGCCT	AGTAACGGCG	AGTGAAGCGG	CAACAGCTCA
61	AATTTGAAAG	CTAGCCTTCG	GGTTCGCATT	GTAATTTGTA	GAGGATGATT	TGGGGAAGCC
181	GCCTGTCTAA	GTTCTTGGGA	ACAGGACGTC	ATAGAGGGTG	AGAATCCCGT	ATGTGACAGG
241	AAATGGCACC	CTATGTAAAT	CTCCTTCGAC	GAGTCGAGTT	GTTTGGGAAT	GCAGCTCTAA
361	ATGGGAGGTA	AATTTCTTCT	AAAGCTAAAT	ATTGGCGAGA	GACCGATAGC	GCACAAGTAG
421	AGTGATCGAA	AGATGAAAAG	CACTTTGGAA	AGAGAGTTAA	AAAGCACGTG	AAATTGTTGA
481	AAGGGAAGCG	CTTGCAATCA	GACTTGTTTA	AACTGTTCGG	CCGGTCTTCT	GACCGGTTTA

الشكل ( 7 ) : تتابعات القواعد النيتروجينية لعزلة الفطر AP5



1	GCGGAGGAAA	AGAAACCATC	AGGGATTGCC	TAGTACGGCG	AGTGAAGCGG	CACAGCTCAA
61	ATTTGAAAGC	TAGCCTTCGG	GTTCGCATTG	TAATTTGTAG	AGGATGATTT	GGAGAAGCCG
181	CCTGTCTAAG	TTCCTTGGAA	CAGGACGTCA	TAGAGGGTGA	GAATCCCGTA	TGTGACAGGA
241	AATGGCACCC	TATGTAATC	TCCTTCGACG	AGTCGAGTTG	TTTGGGAATG	CAGCTCTAAA
361	TGGGAGGTAA	ATTTCTTCTA	AAGCTAAATA	TTGGCGAGAG	ACCGATAGCG	CACAAGTAGA
421	GTGATCGAAA	GATGAAAAGC	ACTTTGGAAA	GAGAGTTAAA	AAGCACGTGA	AATTGTTGAA
481	AGGGAAGCGC	TTGCAATCAG	ACTTGTTTAA	ACTGTTCGGC	CGGTCTTCTG	ACCGTTTTAC

الشكل ( 8 ) : تتابعات القواعد النيروجينية لعزلة الفطر AP6

1	GCGGAGGAAA	AGAAACCAAC	AGGGATTGCC	CTAGTAACGG	CGAGTGAAGC	GGCAACAGCT
61	CAAATTTGAA	AGCTAGCCTT	CGGGTTCGCA	TTGTAATTTG	TAGAGGATGA	TTTGGGGAAG
181	CCGCTGTCT	AAGTTCCTTG	GAACAGGACG	TCATAGAGGG	TGAGAAATCCC	GTATGTGACA
241	GAAATGGCA	CCCTATGTAA	ATCTCCTTCG	ACGAGTTCGAG	TTGTTGGGA	ATGCAGCTCT
361	AAATGGGAGG	TAAATTTCTT	CTAAAGCTAA	ATATTGGCGA	GAGACCGATA	GCGCACAAGT
421	AGAGTGATCG	AAAGATGAAA	AGCACTTTGG	AAAGAGAGTT	AAAAAGCACG	TGAAATTGTT
481	GAAAGGGAAG	CGCTTGCAAT	CAGACTTGTT	TAAACTGTTC	GGCCGGTCTT	CTGACCGGTT

الشكل ( 9 ) : تتابعات القواعد النيروجينية لعزلة الفطر AP7

وتم تأكيد هوية الفطريات المعزولة استناداً الى بيانات الحمض النووي ضمن منطقة Its وشخصت على انها تعود *A.pullulans* من قبل ( 29 ) . كما تمكن ( 30 ) من تشخيص عدة عزلات من الفطر *A.pullulans* معزولة من قطع الاخشاب بتقنية PCR وكانت نتائج تضخيم الحمض النووي حزم منفردة بوزن جزيئي بلغ 600 زوج قاعدي . وجاءت النتائج التي تم التوصل إليها مشابهة لما توصل إليه ( 31 ) عند استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل لتشخيص 48 عزلة من *A.pullulans* عزلت من اسطع بعض الفواكه والخضار . أن تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل واحدة من اهم المعطيات العلمية المهمة في مجال التشخيص الدقيق لعزلات الفطر *A.pullulans* إذ تعتبر الطريقة المرجعية الحديثة في مختبرات البحث العلمي للتمييز بين الكائنات الدقيقة حتى مستوى السلالات . كما أن منطقة ITS تعتبر كشفرة DNA barcode في تشخيص العديد من الفطريات K حيث ان التباير في هذه المنطقة يعد صفة تشخيصية خاصة كون ان لكل جنس ونوع فطري تسلسل خاص به ومتباين في الانواع والاجناس المختلفة وقد ساعدت في التمييز بين الأنواع المتقاربة تصنيفياً لنفس جنس *Aureobasidium* حيث سجلت اطوال هذه المنطقة في الانواع المعزولة 600 زوج قاعدي وقد برهنت قدرتها على التمييز بين العزلات القريبة من بعضها وراثياً .

#### المصادر

- 1- Yarlova, N.A.; deHoog, G.S. and Gerrites, U.E. 1999. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. *Stud. Mycol.*, 43: 63-69.
- 2- West, T.P. 2012. Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* ATCC 201253 cells adsorbed onto cellulose anion and cation exchanges. *ISRN Microbiol.*, 2: 1-4.
- 3-Israilides, C.; Scanlon, B.; Smith, A. and Jumel, K. 1994. Characterization of pullulans produced from agro-industrial wastes. *Carbohydrate Polymers.*, 25: 203-209.
- 4- Chan, G.; Bamadhaj, H.; Gan, H.M. and Rashid, N.A. 2012. Genome sequence of *Aureobasidium pullulans* AY4, an emerging opportunistic fungal pathogen with diverse biotechnological potential. *Genome announcement.*, (9): 1419-1420.



- 5-Gaur, R.; Singh, R.; Gupta, M. and Gaur, M.K. 2010. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *Biotechnol.*, 9(47): 7989-7997.
- 6-Singh, R.; Gaur, R.; Tiwari, S. and Gaur, M.K. 2012. Produce of pullulan by a thermotolerant *Aureobasidium pullulans* strain in non- stirred fed batch fermentation process. *Microbiol.*,18:1042-1050.
- 7-Lotrakul, P.; Unhapattaratitilul, P.; Seplanan, T. and Prasongsuk, K. 2013. An aubasidan-like B-glucan produced by *Aureobasidium pullulans* in Thailand *Sci. Asia.*, 39: 363-368.
- 8-Stratilova, E.; Dzurova, M. and Omelkova, J. 2004. Purification and biochemical characterization of polygalacturonases produced by *Aureobasidium pullulans* . *Biotechnol Lett.*, 18:41-44.
- 9-Arzanlou, M. and Khodaei, S. 2012. *Aureobasidium iraianum* , a new species on bamboo from Iran . *Mycosphere.*, 3(4): 404-408.
- 10-Wachowska, U.; Konopka, I.; Kucharska, K. and barowska, J. 2013. *Aureobasidium pullulans* used a biological control agent field conditions effects the microbial Quality of winter wheat grain. *World acad of Sci, Eng. Technol.*, 7(7): 7-24.
- 11-Thirumavalavan, K; Manikkandan, K.R. and Dhanasekar, R. 2008. Batch fermentation kinetics of pullulan from *Aureobasidium pullulans* using cost substrates. *Biotechnol.*, (92): 317-322.
- 12-Zalar, P; Gostincar, C; Ursic, V. and Gunde-Cimeman, N. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties . *Studies in Mycology.*, 61: 21-38.
- 13-Ray, R.C. and Moorthy, S.N. 2006. Exopolysaccharide pullulan production from cassava starch residue by *Aureobasidium pullulans* strain MTTC1991. *Ind. Res.*, 66:252-255.
- 14-Singh, R.; Gaur.R.; Guar, M.K.; Pandey, P.K and Jamel, F. 2015. Antimicrobial activity of a thermotolerant *Aureobasidium pullulans* strain isolated from faizabad region of uttar pradeshin India. *Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, 4930: 740-744.
- 15-Hani, M. and Salwa, S.W. 2014. Pullulan production from *Aureobasidium pullulans* by continuous culture. *MicrobiolISSN.1( 6):* 11-15.
- 16- Pollock, T.J.; Thorne, L. and Armentrout, R.W. 1992. Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high molecular weight pullulan with reduced pigmentation . *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 : pp.877- 883 .
- 17- Ono, K.; Yassuda, N. and Ueda, S. 1997. Effect of pH an pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* S-I. *agric. Biol. Chem.*,41: 2113-2118.
- 18-Ranganth, H.R. and Sheeba, G.S. 2002. PCR-fingerprinting of some *Trichoderma* isolates from two indian type culture collections-and for re-identification of these economically important fungi. *Curr. Sci.*, 83(4): 372-374.
- 19-Shafique, S.; Bajwa, R. and Shafique, S. 2011. Strain improvement in *Trichoderma viride* through mutation for over expression of cellulase and characterization of mutants using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Afr. J. Biotechnol.*, 10(84): 19590-19597.
- 20-Plaza, G.; Upchurch, R.; Brigmon, R.; Whitman, W. and Ulfig, K. 2004. Rapid DNA extraction for screening soil filamentous fungi using PCR amplification. *Polish. J. of Environ Studies.*, 13(3): 315-318.



- 21-Elke, J.; Jos, A.M.P.; Houbraken, M.M.; Olaf, C.G. and Robert, A.S. 2016. *Aureobasidium melanogenum*: a native of dark biofinishes on oil treated wood. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109: 661–683.
- 22- Laron, D. 1987. *Medical Important Fungi*. Elsevier Science Publishing Co, Inc.; New York, USA.
- 23-Lotrakul, P.; Deenarn, P.; Prasongsuk, S. and Punnapayak, H. 2009. isolation of *Aureobasidium pullulan* from bathroom surfaces and their antifungal activity against some aspergilla. *Microbiol. Sci.*, 3(5): 253-257.
- 24-Mroz, E.M.; Krysiak, M.W.; Dzieriol, R. and Miekus, 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.*, 13(3): 13-22.
- 25-Sing, R.; Gaur, R.; Bansal, S. and Gaur, K. 2015. *Aureobasidium pullulan*– A Industrially important pullulan producing black yeast. *Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, 4(10): 605-622.
- 26- عبدالهادي ، شمال يونس . 2014 . تنقية وتوصيف أنزيم السليوليز من عزلة محلية للفطر *Trichoderma harzianum* ودراسة بعض تطبيقاته وتحسين إنتاجية الأنزيم باستخدام تقنية عزل ودمج البروتوبلاست . أطروحة دكتوراه . كلية التربية للعلوم الصرفة . جامعة الموصل . العراق .
- 27-Thirumavalavan, K.; Manikkadan, T.R. and Dhanasekar, R. 2009. Pullulan production from coconut by products by *A. pullulans*. *Biotechnol.*, 8(2):254-258.
- 28- Ganduri, V.S.R.; Rao, K.R.S. and Poda, S . 2016. Production of Pullulan using Jaggery as substrate by *Aureobasidium pullulans* MTCC 2195. *Biotechnol.SCI.*, 10(2): 153-160.
- 29-Arzanlou, M. 2014. Molecular characterization of *Aureobasidium species* in Iran. *Res. Mol. Med.*, 2(2): 28-33.
- 30-Ray, M.J.; Dickinson, D.J. and Buck, A. 2004. *Aureobasidium* or *Hormonema*? A Genetic Approach. Paper prepared for the 35<sup>th</sup> Annual Meeting Ljubljana, Slovenia, 6-10 June.
- 31-Curtis, F.; Caputo, L.; Castoria, R. and Cicco, V.D. 2004. Use of fluorescent amplified fragment length polymorphic (FAFLP) to identify specific molecular markers for biocontrol agent *Aureobasidium pullulans* strain LS30. *Biology and Technol.*, 34: 179-186.