



## Molecular screening of astaxanthin-producing yeasts of birch sap-flows in Alborz Province of Iran

Faezeh Ajourloo<sup>1</sup>, Mohsen Vaez<sup>2</sup>, Jafar Hemmat<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ph.D. student, Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran. <sup>2</sup>Assistant Professor, Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** The carotenoid-producing yeasts have a widespread distribution worldwide. However, isolation of carotenoid-producing yeasts with valuable astaxanthin have been only reported from limited areas and specific habitats. The aim of this study was to apply the multiple polymerase chain reaction method for faster molecular screening of isolates for the yeasts in the exudation sap from birch trees (*Betula pendula* Roth.) in Alborz Province of Iran with astaxanthin production capacity and to evaluate its efficiency.

**Materials & Methods:** This cross-sectional study was carried out by sampling in May 2018 from one of the natural habitats of birch trees *Batula Pendula* in Alborz Province, Iran. After isolation of yeasts using selected media and purification of yeast colonies with various pink to red colors, yeasts genomic nucleic acids were extracted and molecular screening for astaxanthin-producing detection of isolates was performed by multiple polymerase chain reaction (Multiplex-PCR).

**Results:** Out of 42 pigmented colonies during sampling and isolation in one cross-sectional study, 23 pink to red colonies were evaluated by Multiplex-PCR method. Of these isolates, three were positive and the rest were negative. The results were validated by determining the ribosomal gene sequencing.

**Conclusion:** The present study demonstrates the specificity of the multiple polymerase chain reaction method in fast and cost-effective molecular screening of astaxanthin-producing yeast isolates and the applicability of this method to study other natural habitats of these yeasts.

**Keywords:** Yeast, Carotenoid, Astaxanthin, Multiple polymerase chain reaction (Multiplex-PCR), Birch trees.

Received: 18 October 2020

Revised: 26 October 2020

Accepted: 15 November 2020

Correspondence to: Mohsen Vaez

Tel: +98 2156276020

E-mail: [mvaez@irost.ir](mailto:mvaez@irost.ir)

Journal of Microbial World 2021, 13(4): 349-359



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



## غربالگری مولکولی مخمرهای مولد آستاگزانتین تراوشات درختان توس استان البرز

فائزه اجرلو<sup>۱</sup>، محسن واعظ<sup>۲\*</sup>، جعفر همت<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری.  
<sup>۲</sup> استادیار، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری.

### چکیده

**سابقه و هدف:** مخمرهای مولد کاروتنوئید دارای پراکنش وسیعی در مناطق مختلف دنیا می باشند. در این بین جداسازی مخمرهای مولد کاروتنوئید با ارزش آستاگزانتین تنها از مناطق محدود و زیستگاه های خاص گزارش شده اند. این مطالعه با هدف بکارگیری روش واکنش زنجیره ای پلیمرز چندگانه برای غربالگری مولکولی سریعتر جدایه ها با توان تولید آستاگزانتین از تراوشات درختان توس استان البرز و بررسی کارایی آن انجام شد.

**مواد و روش ها:** این پژوهش بصورت مقطعی با نمونه برداری در اردیبهشت ماه ۱۳۹۷ از یکی از رویشگاه های طبیعی درختان توس گونه بتولا پندولا در استان البرز صورت پذیرفت. پس از جداسازی مخمرها بر روی محیط های انتخابی و خالص سازی کلنی هایی با رنگ های متنوع صورتی تا قرمز، اسیدنوکلئیک ژنومی مخمرها استخراج و غربالگری مولکولی جدایه ها از نظر قابلیت تولید آستاگزانتین با واکنش زنجیره ای پلیمرز چندگانه بررسی گردید.

**یافته ها:** از مجموع ۴۲ کلنی واجد رنگدانه در هنگام نمونه برداری و جداسازی اولیه، تعداد ۲۳ کلنی به رنگ های صورتی تا قرمز با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز چندگانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. از بین این جدایه ها سه مورد مثبت و بقیه منفی تشخیص داده شدند. صحت نتایج با تعیین ترادف ریبوزومی تایید شد.

**نتیجه گیری:** مطالعه حاضر بیانگر قابلیت روش واکنش زنجیره ای پلیمرز چندگانه در غربالگری مولکولی سریع و مقرون به صرفه جدایه های مخمری مولد آستاگزانتین و امکان بکارگیری این روش برای بررسی زیستگاه های طبیعی دیگر این مخمرها می باشد.

**واژگان کلیدی:** مخمر، کاروتنوئید، آستاگزانتین، واکنش زنجیره ای پلیمرز چندگانه، درختان توس.

پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۸/۲۵

ویرایش مقاله: ۱۳۹۹/۸/۵

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۷/۲۷

### مقدمه

موفق مخمرها دخالت دارند و موجب می گردند تا اجتماعات مخمری زیستگاه های مختلفی را تصرف نموده و گاه با یکدیگر هم پوشانی داشته باشند (۵). در بین اجتماعات مخمری، آنهایی که به شکل ثابت در یک زیستگاه یافت شده و جزء اساسی و لاینفک میکروبیوتای آن جایگاه خاص را تشکیل می دهند تحت عنوان مخمرهای بومی (autochthonous) آن زیستگاه نامیده می شوند و گونه هایی که به شکل متغیر و اتفاقی در یک زیستگاه یافت می شوند تحت عنوان مخمرهای غیر بومی

مطالعات انجام شده توسط بسیاری از محققین مشخص نموده که مخمرها در کره حیات پراکندگی تصادفی نداشته و اجتماعات مخمری و زیستگاه های آنها، یکی از مشخصات ویژه این دسته از میکروارگانیسم ها را در بر می گیرد (۴ و ۱). در این بین مجموعه عوامل زیستی، شیمیایی و فیزیکی بر پراکندگی

\* آدرس برای مکاتبه: تهران، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری.

پست الکترونیک: [mvaez@irost.ir](mailto:mvaez@irost.ir)

تلفن: ۰۲۱۵۶۲۷۶۰۲۰



درختان توس نقره‌ای (*Betula pendula* Roth.) در ایران به چند ناحیه کوچک در شمال و شمال غرب محدود می‌گردند (۹). در استان البرز، تنها رویشگاه درخت توس نقره‌ای (Silver birch) در روستای شهرستانک در بین دره‌هایی در ضلع غربی این روستا در چند توده مشاهده می‌گردند. درختان توس این منطقه در طول جغرافیایی (شرقی)  $51^{\circ} 23'$  و عرض جغرافیایی (شمالی)  $35^{\circ} 44'$  در ارتفاع  $2404$  متر از سطح دریا واقع شده‌اند (۹). شیره تراوش شده از این درختان حاوی مواد مغذی و معدنی فراوانی است که نیاز تغذیه‌ای بسیاری از مخمرها به ویژه مخمرهای کاروتنوئیدی می‌باشد (۱۰ و ۱۱). هدف از این مطالعه غربالگری مولکولی ساده و سریع جدایه‌های مخمری مولد کاروتنوئید آستاگزانتین از میان کلنی‌های مخمری خالص شده صورتی تا قرمز به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

*الف) نمونه برداری:* رویشگاه درختان توس واقع در روستای شهرستانک در ناحیه سردسیر با بستر سنگی و چشمه‌های دائمی می‌باشد. نمونه‌برداری از شیره تراوش شده طبیعی درختان و توسط سمپلر و پیپت پاستور در شرایط سترون صورت گرفت. همچنین از تراوشات خشک شده بر روی تنه درخت نیز با استفاده از سواب سرپنبه‌ای استریل نمونه‌برداری شد (شکل ۱).

نمونه‌برداری در اواسط اردیبهشت سال ۱۳۹۷ انجام و حداکثر دمای روزانه منطقه هنگام نمونه‌برداری ۲۲ درجه سلسیوس ثبت گردید. انتقال نمونه‌ها بر روی یخ در کمترین زمان به آزمایشگاه صورت پذیرفت (۵).

*ب) کشت و جداسازی مخمرها:* شیره نمونه‌برداری شده، در شرایط سترون در محلول بافر فسفات استریل رقیق گردید و رقت‌های مختلفی از نمونه تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از این رقت‌ها با تنظیم pH: ۳/۵ و با افزودن آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل شرکت مرک (Merck) آلمان، به محیط‌های جداسازی مناسب بیست مولد آگار (Yeast Mold Agar) شرکت دیفکو (Difco)

(allochthonous) نام برده می‌شوند (۵). در مبحث اکولوژی مخمرها، به مسائلی مانند نحوه تکثیر مخمرها در طبیعت، سوبستراهای حمایت‌کننده رشد مخمرهای خاص، رقابت بین گونه‌های مختلف مخمری و نیز رقابت بین آنها و سایر میکروارگانیسم‌ها، اثر ترکیبات شیمیایی سوبستراها بر روی میکروبیوتای مخمری، ناقلین موثر بر پراکندگی مخمرها در طبیعت و... پرداخته می‌شود (۵ و ۶). یکی از زیستگاه‌های مخمرها گیاهان هستند که به سبب داشتن توانایی فتوسنتز و ساختن بسیاری از ترکیبات، زیستگاه‌های مناسبی را برای مخمرهای مختلف مهیا می‌سازند. در بسیاری از گیاهان، پدیده تراوش شیره (fluxing) از بخش‌های مختلف از محل زخم‌های ایجاد شده توسط نیش حشرات، شکاف‌ها و سوراخ‌های ایجاد شده بر روی تنه آنها سبب جریان شیره آبکی حاوی مواد غذایی متنوع گردیده و بسیاری از میکروارگانیسم‌ها را به خود جلب می‌نماید. شیره درختان معمولاً بعلت حضور میکروارگانیسم‌ها و تولید پلی‌ساکارید در آنها لزج است و به همین علت تحت نام تراوشات لزج (slime flux) نامیده می‌شوند (۴).

مخمرهای مولد کاروتنوئید آستاگزانتین تاکنون تنها مشتمل بر گونه *Xanthophyllomyces dendrorhous* و فرم غیر جنسی آن بنام *Fafia dendrorhous* (Phaffia rhodozyma) می‌باشد و جداسازی آن عمدتاً از تراوشات لزج درختان توس مناطق خاصی از دنیا مثل ژاپن، آلاسکا و روسیه انجام شده و این زیستگاه‌ها به عنوان جایگاه اصلی این مخمر گزارش شده‌اند (۵). از طرفی ترکیبات شناسایی شده در این شیره گیاهی در برابر نور ایجاد اکسیژن نوزاد (singlet oxygen) می‌کنند و چون این مخمرها دارای یک مکانیزم دفاعی کاروتنوئیدی هستند به ختنی نمودن اکسیژن نوزاد و حفظ مخمر در برابر رادیکال‌های آزاد محیط شده و موجب حضور غالب این مخمر در محیط می‌شوند. خواص سوپر آنتی‌اکسیدانی آستاگزانتین تولیدی این مخمر سبب جلب توجه ویژه به این گونه از لحاظ صنعتی و کاربردی شده است (۷ و ۸).



شکل ۱: نمونه برداری از جنگل‌های توس شهرستانک. (۱-۳) جنگل و درختان توس روستای شهرستانک، (۴) شیره تراوش شده بطور طبیعی از درخت (۵) نمونه شیره جمع‌آوری شده درخت توس تراوش شده به طور طبیعی (۶) نمونه شیره درخت توس خشک شده برجا مانده از سال‌های قبل

پرایمر عمومی و یک پرایمر اختصاصی و ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA پلیمرز بایولاین (Bioline) انگلستان در بافر با غلظت نهایی 1X تهیه شد. یک کنترل مثبت از سویه مولد آستاگزانتین (DSM 5626) و دو کنترل منفی شامل کنترل منفی آب مقطر به جای DNA و کنترل منفی DNA مخمر غیرمولد آستاگزانتین (PTCC 5257 و PTCC 5258) استفاده شد (۱۳).

(و) آنالیز بیوانفورماتیکی و طراحی پرایمر: برای تکثیر ناحیه هدف حدود ۶۵۰ جفت بازی بخش D1/D2 زیر واحد بزرگ ریپوزومی، ابتدا پرایمرهای عمومی 5'-GCA TAT CAA F63: 3'-TAA GCG GAG GAA AAG LR3: 5'-GGT CCG و 3'-TGT TTC AAG ACG G (۱۴ و ۱۵). به دنبال پرایمر اختصاصی XaR1 برای مخمر گزانتوفیلومایسس دندروروس (فافیا دروزیما) در این ناحیه در راستای تفکیک از دیگر مخمرهای کاروتنوئیدی طراحی شد (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در واکنش Multiplex-PCR

نام پرایمر	(3'-5') ترادف	منبع
F63	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	20
XaR1	GGACTGTGACACAGGCCGG	این مطالعه
LR3	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	20

ز) برنامه دمایی زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه: برنامه دمایی شامل یک چرخه ۲ دقیقه‌ای در ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه مشتمل بر ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه، ۲۵ ثانیه در ۵۴ درجه و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه و نهایتاً یک چرخه ۷۲ درجه سلسیوس

آمریکا و افزوده و با استفاده از میله شیشه‌ای سرکج کشت داده شدند. پلیت‌های تلقیح شده در دمای ۲۰ درجه سلسیوس برای مدت یک هفته تا یک ماه بسته به میزان تراکم کلنی‌های مخمری و سایر قارچ‌ها نگهداری شدند. در این مدت و در صورت حضور میسلیم‌های قارچی با رشد لجام گسیخته، اقدام به سوزاندن آنها گردید (۵). همچنین پلیت‌های کشت برای مدت طولانی‌تر در دمای یخچال نگهداری گردید و ظهور کلنی‌های جدید مورد بررسی و خالص‌سازی منظم با لوپ فیلدوپلاتین سرسوزنی قرار گرفت و عموماً دو مرتبه پاساژ برای به‌دست آوردن کشت خالص از هر کلنی مخمری جداسازی شده کفایت نمود.

ج) غربالگری اولیه جدایی‌ها: رنگ کلنی مخمرها، شکل، قوام، اندازه، حاشیه و وجود برآمدگی سطحی کلنی‌های، شاخص اولیه قرار گرفت و کلنی مخمرهای دارای رنگ صورتی تا قرمز برای بررسی از نظر شناسایی مولکولی توان تولید آستاگزانتین در مرحله بعد، جداسازی و خالص‌سازی گردیدند.

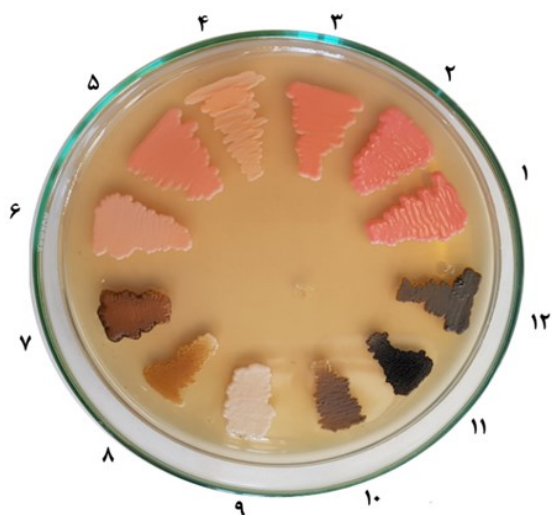
د) استخراج DNA ژنومی: استخراج اسیدنوکلئیک ژنومی کلنی مخمرهای خالص شده با استفاده از ذرات شیشه و لیز قلیایی انجام شد (۱۲). میزان کمی و کیفی DNA استخراجی مخمرها توسط دستگاه نانودراپ ساخت شرکت بیوتک (BioTek) آمریکا مشخص گردید.

ه) اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه: واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۵ نانوگرم DNA استخراجی از کلنی‌های خالص مخمری بعنوان الگو، ۱ میکرومولار  $MgCl_2$ ، ۲ میکرومولار از هر کدام یک از dNTPs، ۰/۰۴ میکرومولار از دو

جدول ۲: آنالیز بیوانفورماتیکی طراحی پرایمر اختصاصی مخمرهای مولد آستاگزانتین

نام مخمر	میزان اختصاصیت پرایمر XaR1 در مکان اتصال به ژن هدف	تعداد باز جفت نشده با پرایمر
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (DQ661033)	.....	0
<i>Phaffia rhodozyma</i> (AF189871)	.....	0
<i>Cystofilobasidium macerans</i> (JF501392)	TT.....C.....	3
<i>Cystobasidium pinicola</i> (AF189949)	.TA.T.CA....TG....T	8
<i>Rhodotorula glutinis</i> (FJ345357)	T...A.C....CT.....	5
<i>Dioszegia butyracea</i> (EU266530)	T...A.C....CT.....T	6
<i>Rhodosporidium toruloides</i> (KT923029)	TT..A.C.CAC.....T	4
<i>Vishniacozyma victoriae</i> (LC203741)	...A.C.C.C....T	5

با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه، تکثیر ناحیه هدف حدود ۶۵۰ بازی توسط پرایمرهای عمومی F63 و LR3 در کلیه مخمر صورت می‌پذیرد لیکن تکثیر قطعه کوچک ۱۵۳ جفت بازی توسط پرایمر اختصاصی XaR1 تنها در مخمرهای مولد آستاگزانتین مشاهده می‌شود. نتیجه ژل الکتروفورز برخی از این جدایه‌ها با روش Multiplex-PCR در شکل (۳) آمده است.



شکل ۲: کلنی برخی از جدایه‌های مخمری. (۱) سیستوبازیدیوم پینیکولا (*Cystobasidium pinicola*), (۲) سیستوفیلوبازیدیوم ماسرانس (*Cystofilobasidium macerans*), (۳) یوستیلنتیلوما گرامینیس (*Ustilentyloma graminis*), (۴) گزانتوفیلومایسس دندروروس (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), (۵) ردوسپوریادیوبولوس کلستری (*Rhodosporidiobolus colostri*), (۶) ویشنیاکوزیما کارنسنس (*Vishniacozyma carnescens*), (۷-۱۲) مخمرهای غیر کاروتنوئیدی.

۵ دقیقه برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر پالم‌سایکلر (Palm Cycler) ساخت کشور هند انجام شد (۱۶ و ۱۷). الکتروفورز محصولات تکثیر شده با روش Multiplex-PCR بر روی ژل ۱٪ آگارز الکتروفورز مشاهده گردید و به منظور تایید نتایج، توالی‌یابی قطعه بزرگ هدف به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد.

ح) آنالیزهای آماری: با استفاده از نرم افزار پروسک (ProSeq) نسخه ۲/۹۱ نتایج خوانش بررسی و ویرایش گردید (۱۸). میزان تشابه توالی‌های خوانش شده نمونه‌ها با توالی‌های ثبت شده در پایگاه داده‌های اطلاعات ژنومی (NCBI (GenBank و توسط نرم افزار بلاست (Blast) مقایسه و نزدیک ترین سویه مرتبط تعیین گردید (۱۹). تعیین روابط فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN نسخه ۵.۲.۱۰ مشخص شد (۲۰).

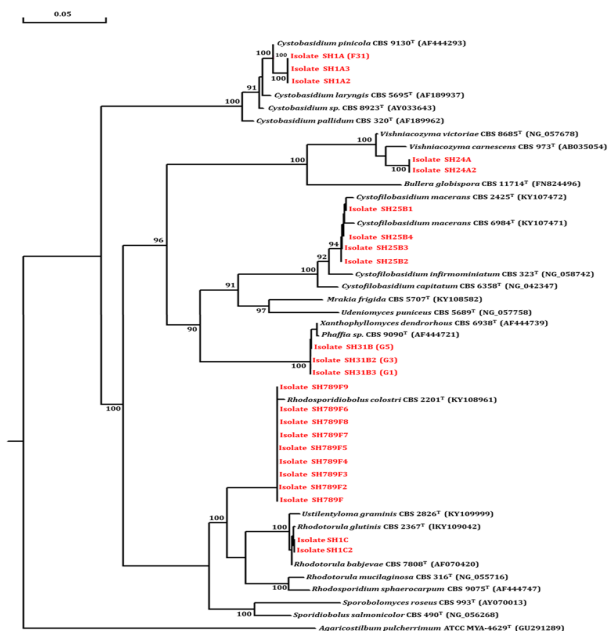
ط) آنالیز تکمیلی بررسی تولید آستاگزانتین: پس از کشت یک هفته‌ای سویه‌های با توان تولید آستاگزانتین، دیواره سلول‌های مخمری با روش شیمیایی تخریب و کاروتنوئید آن‌ها استخراج (۲۱) و سپس با استفاده از روش کروماتوگرافی نازک لایه Thin-layer chromatography (TLC) و استاندارد مربوطه تولید آستاگزانتین تایید گردید (۲۲).

### یافته‌ها

غربالگری اولیه برای تفکیک جدایه‌ها بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی کلنی‌های خالص شده حاکی از مجموع ۲۴ جدایه مختلف صورتی، نارنجی، قرمز داشتند (شکل ۱).

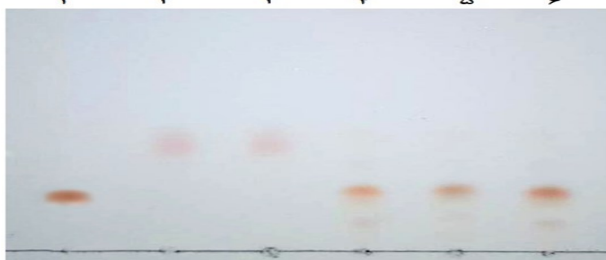


درخت فیلوژنتیک جدایه‌ها به روش Neighbor-joining و ضریب Bootstrap صد با استفاده از نرم افزار DNAMAN شد (شکل ۴).

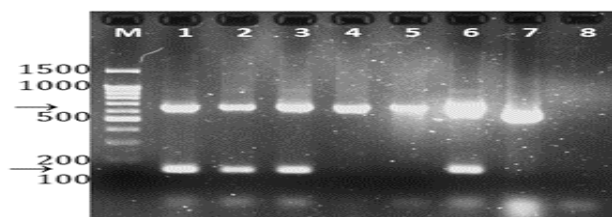


شکل ۴: درخت فیلوژنتیک مربوط به بخش D1/D2 زیر واحد بزرگ ریبوزومی جدایه‌ها با استفاده از روش Neighbor-joining و ضریب Bootstrap صد. مخمر آگاریکاستیلوم پولچریمم به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است. بر مبنای مقیاس نشان داده شده، نسبت تفاوت نوکلئوتیدی با طول شاخه‌ها متناسب است. شماره‌های گره‌ها، احتمال ظاهر شدن هر کدام از شاخه‌ها به درصد طی صد تکرار Bootstrap است.

همچنین نتایج حاصل از کروماتوگرافی نازک لایه، بیانگر توان تولید آستاگزانتین جدایه‌های قرارگرفته در جنس گزانتوفیلومایسس بود (شکل ۵).



شکل ۵: تایید توان تولید جدایه از نظر تولید آستاگزانتین بروش کروماتوگرافی نازک لایه: (۱) نمونه استاندارد آستاگزانتین (۲) مخمر Rhodotorula mucilaginosa PTCC 5257 (۳) Rhodotorula glutinis PTCC 5258 هر دو غیر مولد آستاگزانتین؛ (۴) (SH31B3 (G1) (۵) (SH31B2 (G3) (۶) (SH31B (G5) هر سه از جدایه‌های مولد آستاگزانتین.



شکل ۳: الکتروفورز محصولات تکثیر شده با روش M. Multiplex-PCR مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت GenON آلمان، ستون ۳-۱) جدایه‌های منتخب مولد آستاگزانتین، ۴-۵) برخی جدایه‌های منتخب غیرمولد آستاگزانتین (۶) کنترل مثبت (گزانتوفیلومایسس دندروروس) (۷) کنترل منفی (ردوترولا گلوئینیس PTCC:5258) (۸) کنترل منفی (بدون DNA).

بر اساس ترادف یابی بخش‌های D1/D2 ژن زیر واحد بزرگ ریبوزومی، سه جدایه در غربالگری مولکولی مثبت و بقیه منفی گزارش گردیدند (جدول ۴).

جدول ۴: جدایه‌های منتخب و نزدیکترین سویه‌های مرجع

ردیف	نام جدایه	سویه مرجع با بیشترین تطابق	درصد تشابه	توان تولید آستاگزانتین
1	SH789F	<i>Rhodospiridiobolus colostri</i> CBS 2201 <sup>T</sup>	100	غیر مولد آستاگزانتین
2	SH789F2	<i>Rhodospiridiobolus colostri</i> CBS 2201 <sup>T</sup>	100	غیر مولد آستاگزانتین
3	SH789F3	<i>Rhodospiridiobolus colostri</i> CBS 2201 <sup>T</sup>	100	غیر مولد آستاگزانتین
4	SH789F4	<i>Rhodospiridiobolus colostri</i> CBS 2201 <sup>T</sup>	100	غیر مولد آستاگزانتین
5	SH789F5	<i>Rhodospiridiobolus colostri</i> CBS 2201 <sup>T</sup>	100	غیر مولد آستاگزانتین
6	SH789F6	<i>Rhodospiridiobolus colostri</i> CBS 2201 <sup>T</sup>	100	غیر مولد آستاگزانتین
7	SH789F7	<i>Rhodospiridiobolus colostri</i> CBS 2201 <sup>T</sup>	100	غیر مولد آستاگزانتین
8	SH789F8	<i>Rhodospiridiobolus colostri</i> CBS 2201 <sup>T</sup>	100	غیر مولد آستاگزانتین
9	SH789F9	<i>Rhodospiridiobolus colostri</i> CBS 2201 <sup>T</sup>	100	غیر مولد آستاگزانتین
10	SH31B3 (G1)	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> CBS 6938 <sup>T</sup>	99.8	مولد آستاگزانتین
11	SH31B3 (G3)	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> CBS 6938 <sup>T</sup>	99.8	مولد آستاگزانتین
12	SH31B3 (G5)	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> CBS 6938 <sup>T</sup>	99.8	مولد آستاگزانتین
13	SH25B1	<i>Cystoflobasidium macerans</i> CBS 2425 <sup>T</sup>	99.7	غیر مولد آستاگزانتین
14	SH25B2	<i>Cystoflobasidium macerans</i> CBS 2425 <sup>T</sup>	99.7	غیر مولد آستاگزانتین
15	SH25B3	<i>Cystoflobasidium macerans</i> CBS 2425 <sup>T</sup>	99.7	غیر مولد آستاگزانتین
16	SH25B4	<i>Cystoflobasidium macerans</i> CBS 2425 <sup>T</sup>	99.7	غیر مولد آستاگزانتین
17	SH1C	<i>Ustilentyloa graminis</i> CBS 2826 <sup>T</sup>	99.8	غیر مولد آستاگزانتین
18	SH1C2	<i>Ustilentyloa graminis</i> CBS 2826 <sup>T</sup>	99.8	غیر مولد آستاگزانتین
19	SH1A (F31)	<i>Cystobasidium pinicola</i> CBS 9130 <sup>T</sup>	99.2	غیر مولد آستاگزانتین
20	SH1A2	<i>Cystobasidium pinicola</i> CBS 9130 <sup>T</sup>	99.2	غیر مولد آستاگزانتین
21	SH1A3	<i>Cystobasidium pinicola</i> CBS 9130 <sup>T</sup>	99.2	غیر مولد آستاگزانتین
22	SH24A	<i>Vishniacozyma carnescens</i> CBS 973 <sup>T</sup>	99.3	غیر مولد آستاگزانتین
23	SH24A	<i>Vishniacozyma carnescens</i> CBS 973 <sup>T</sup>	99.3	غیر مولد آستاگزانتین

## بحث

می‌تواند این نوع مخمر را از انواع غیر مولد آستاگزانتین متمایز سازد در حالی که چنین روش‌هایی زمانبر و پرهزینه می‌باشند. خصوصیات منحصر به فرد فیزیولوژیک این مخمر مانند عدم توانایی رشد در دمای بالاتر از ۲۷ درجه سلسیوس، توانایی بیوشیمیایی تخمیر قندهای دیگر از جمله مالتوز، سوکروز و رافینوز به عنوان شاخص‌های متمایز کننده این مخمر از سایر مخمرهای کاروتنوئیدی نیز با چالش‌هایی روبرو است (۵).

از میان بیش از ۱۲۰۰ ساختار متفاوت کاروتنوئیدی شناسایی شده از بیش از ۷۲۰ منبع در سه قلمرو موجودات زنده، سهم میکروارگانیسم‌ها در تولید آن قابل توجه بوده و به کارگیری روش‌های ساده و مقرون به صرفه، امکان اکتشاف بیشتر این دسته از رنگدانه‌های طبیعی را مهیا می‌سازد (۲۴). این موضوع در خصوص رویشگاه‌های درختان توس ایران و بررسی تنوع میکروبی این درختان نیازمند توجه ویژه است (۹).

تشکیل رادیکال‌های آزاد و اکسیژن نوزاد در شیره درختان توس در معرض نور ماوراء بنفش خورشید، این کنام اکولوژیک را مکان رقابتی برای مخمرها ساخته است. مخمرهای مولد کاروتنوئید به ویژه آستاگزانتین به سبب داشتن ترکیبات کاروتنوئیدی با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی قادر به رشد غالب در این زیستگاه سرشار از مواد مغذی و املاح می‌باشند (۲۵). تراوشات درختان توس به سبب حضور کاروتنوئید سوپر آنتی‌اکسیدان یعنی آستاگزانتین توسط مخمر *گزناتوفیلومایسس دندروروس (فافیادوزیما)*، توان مقابله با شرایط اکسیداتیو و زیست این مخمر در این کنام اکولوژیک را فراهم نموده است (۲۵).

سویه‌های مخمری مولد آستاگزانتین به ندرت گزارش شده و گزارشات مربوط به جداسازی مخمر *گزناتوفیلومایسس دندروروس* به نواحی محدود از مناطق مختلف دنیا خلاصه شده است که گاه میکروبیوتای مخمری مشترکی داشته‌اند. جداسازی ۶۷ سویه از این مخمر توسط گلوبو (Golubev) در سال ۱۹۹۸ از درختان توس اطراف شهر مسکو همراه با برخی مخمرهای کاروتنوئیدی دیگر گزارش شده است (۲۶). در

در این پژوهش زیستگاه بکر و خاص مخمرهای موجود در شیره درختان توس در منطقه تیس بیشه از روستای شهرستانک استان البرز بررسی گردید. با به کارگیری محیط‌های انتخابی برای رشد مخمرها، غربالگری مخمرها ابتدا بر اساس رنگ و ریخت شناسی کلنی با رنگ صورتی تا قرمز و سپس به کارگیری روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه صورت پذیرفت و نتایج با توالی‌یابی تایید شد. از جنس‌های مخمری صورتی تا قرمز تنها جنس *گزناتوفیلومایسس (Xanthophyllomyces)* و شکل غیر جنسی آن یعنی *فافیا (Phaffia)* مولد آستاگزانتین بوده و سایر جنس‌ها مشتمل بر *ردوتورولا (Rhodotorula)*، *دیوزگیا (Dioszegia)*، *سیستوبازیدیوم (Cystobasidium)*، *ردوسپوریدیوبولوس (Rhodosporidiobolus)*، *سیستوفیلوبازیدیوم (Cystofilobasidium)*، *ردوسپوریدیوم (Rhodosporidium)*، *یوستیلنتیلوما (Ustilentyloma)* اسپورودیوبولوس (*Sporidiobolus*)، اسپوروبولومایسس (*Sporobolomyces*)، *ویشنیاکوزیما (Vishniacozyma)* به سبب فقدان برخی ژن‌های مسیر بیوسنتزی، توانایی تولید آستاگزانتین را نداشتند (۵).

مخمر *گزناتوفیلومایسس دندروروس (فافیادوزیما)* به سبب دارا بودن برخی شاخص‌های منحصر به فرد قابلیت تمایز از نظر خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی را از سایر مخمرهای قرمز رنگ کاروتنوئیدی غیر مولد آستاگزانتین دارد (۵). مخمرهای مولد آستاگزانتین تنها گروه از مخمرهای کاروتنوئیدی با توان تخمیر قند گلوکز هستند لیکن آزمون رایج بررسی توانایی تخمیر قند گلوکز با استفاده از روش لوله دورهام زمانبر است (۵). همچنین مسیر بیوسنتز آستاگزانتین در این مخمر مشتمل بر هر سه فرایند غیر اشباع شدن، حلقوی شدن و اکسیژن‌دار شدن می‌باشد (۲۳). لذا به عنوان تنها مولد ساختار کاروتنوئیدی آستاگزانتین در بین مخمرهای شناخته شده، شناسایی نوع ترکیب کاروتنوئیدی به روش‌های مختلف مثل کروماتوگرافی نازک لایه (*Thin-layer chromatography*)

آزمون‌های بیوشیمیایی و توالی‌یابی، زمان‌بر و یا گران می‌باشند. استفاده از این روش با توجه به شاخص‌های منحصر به فرد زیستی و غیر زیستی ایران در مطالعه میکروبیوتای مخمری از سایر رویشگاه‌های درختان توس و مطالعه تجمعات مخمری شکل گرفته مناطق دیگر و در مقاطع مختلف زمانی و بررسی حضور سویه‌های مولد آستاگزانتین پیشنهاد می‌گردد.

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از شورای اسلامی و دهیاری و اهالی محترم روستای شهرستانک کمال تشکر را دارند.

### تعارض منافع

وجود ندارد.

بررسی مخمرهای شیره درختان توس روستای شهرستانک که به روش شناسایی غیرمولکولی توسط نحوی (Nahvi) و همکاران در سال ۲۰۰۰ صورت گرفته است گونه‌های متنوعی از مخمرهای کاروتنوئیدی گزارش شده است در حالی که حضور مخمر *گزناتوفیلومایسس دندروس* به سبب انجام نمونه‌برداری در هوای بالاتر از ۳۰ درجه سلسیوس موفقیت‌آمیز نبوده است (۲۷). حضور این مخمر در مطالعه وبر (Weber) و همکاران در سال ۲۰۰۶ همراه با جنس‌های *سیستوفیلوبازیدیوم* و *سیستوبازیدیوم* نیز گزارش شده است (۲۸). جمعیت جدیدی از سویه‌های مولد آستاگزانتین در مطالعه سال ۲۰۰۸ لیبکایند (Libkind) و همکاران نیز گزارش شده است (۲۹).

استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه در غربالگری مولکولی مخمرها توسط محققین مختلف گزارش شده است (۳۰ و ۳۱). میکروبیوتای مخمری تراوشات گیاهان از جمله تراوشات درختان توس تحت تاثیر عوامل زیستی مثل انتقال توسط پرندگان، حشرات و عوامل غیر زیستی از جمله آب، هوا، دما و شرایط فصلی قرار دارند که در شکل‌گیری تجمعات آنها حائز اهمیت است (۳۲). استفاده از روش‌های غربالگری مولکولی سریع و مقرون به صرفه کارایی جداسازی این گونه مخمرها را افزایش داده و امکان افزایش مقیاس نمونه‌برداری را مهیا می‌سازد (۳۳ و ۳۴). این پژوهش اولین گام در به کارگیری روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه، در غربالگری مولکولی مخمرهای مولد آستاگزانتین درختان توس ایران محسوب می‌گردد.

### نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر که توسط توالی‌یابی و کروماتوگرافی نازک لایه نیز تایید گردیدند نشان داد که به کارگیری روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه در غربالگری مولکولی مخمرهای مولد آستاگزانتین نسبت به آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دارای حساسیت و سرعت مناسب بوده و قابلیت افزایش مقیاس مطالعات در راستای کشف سویه‌های جدید مخمری را تسهیل می‌نماید. این در حالی است که سایر



## References

1. Yurkov AM. Yeasts of the soil—obscure but precious. *Yeast*. 2018 May;35(5):369-78.
2. Stefanini I. Yeast-insect associations: It takes guts. *Yeast*. 2018 Apr;35(4):315-30.
3. Fonseca A, Inácio J. Phylloplane yeasts. In *Biodiversity and ecophysiology of yeasts 2006* (pp. 263-301). Springer, Berlin, Heidelberg.
4. Phaff HJ. Yeasts associated with plants, insects and soil. *Yeasts*/edited by Anthony H. Rose, JS Harrison. 1987.
5. Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T, editors. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier;2011 May 9.
6. Boynton PJ. The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats. *yeast*. 2019 Aug;36(8):473-85.
7. Pereira da Costa D, Campos Miranda-Filho K. The use of carotenoid pigments as food additives for aquatic organisms and their functional roles. *Reviews in Aquaculture*. 2020 Aug;12(3):1567-78.
8. Schmidt I, Schewe H, Gassel S, Jin C, Buckingham J, Hümbelin M, Sandmann G, Schrader J. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011 Feb 1;89(3):555-71.
9. Hosseinzadeh CA, Fallah F, Yousefzadeh H. Genetic Diversity and Differentiation of the Iranian's *Betula pendula* Populations by DNA Polymorphisms of Three (CD, DT, K1K2) Chloroplast Genome Regions. *Iranian Journal of Biology*. 2015; 28(2) 191-201.
10. Weber RW. On the ecology of fungal consortia of spring sap-flows. *Mycologist*. 2006 Nov 1;20(4):140-3.
11. Grabek-Lejko D, Kasprzyk I, Zagula G, Puchalski C. The bioactive and mineral compounds in birch sap collected in different types of habitats. *Baltic Forestry*. 2017 Jan 1;23(2):394-401.
12. Lööke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*. 2011 May;50(5):325-8.
13. Ajorloo, F., Vaez, M., Hemmat, J. Isolation and molecular identification of the carotenoid producing yeasts in the exudation sap from birch trees (*Betula pendula* Roth.) at Marmisho region of Northwest Iran. *Journal of Microbial World*, 2019; 12(2): 139-149. [In Persian]
14. Scorzetti G, Fell JW, Fonseca A, Stanzell-Tallman A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS yeast research*. 2002 Dec 1;2(4):495-517.
15. White TJ, Bruns T, Lee SJ, Taylor JL. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 1990;18(1):315-22.

16. Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2000 May 1;50(3):1351-71.
17. ROSA CA, LACHANCE MA. The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin & Tullock) Meyer & Yarrow. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1998 Oct 1;48(4):1413-7.
18. Filatov DA. ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes*. 2002 Dec;2(4):621-4.
19. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 1990 Oct 5;215(3):403-10.
20. Woffelman C. DNAMAN for Windows, Version 5.2. 10. Lynon Biosoft. Institute of Molecular Plant Sciences, Netherlands: Leiden University. 2004.
21. Valduga E, Valério A, Tatsch PO, Treichel H, Furigo A, Luccio M. Assessment of Cell Disruption and Carotenoids Extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). *Food and Bioprocess Technology*. 2009;2(2):234-8.
22. Weber RW, Davoli P. Teaching techniques for mycology: 20. Astaxanthin, a carotenoid of biotechnological importance from yeast and salmonid fish. *Mycologist*. 2003 Feb 1;17(1):30-4.
23. Barredo JL, García-Estrada C, Kosalkova K, Barreiro C. Biosynthesis of astaxanthin as a main carotenoid in the heterobasidiomycetous yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Journal of Fungi*. 2017 Sep;3(3):44.
24. Sorokina M, Steinbeck C. Review on natural products databases: where to find data in 2020. *Journal of cheminformatics*. 2020 Dec;12:1-51.
25. Schroeder WA, Johnson EA. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *Journal of industrial microbiology*. 1995 Jun 1;14(6):502-7.
26. Golubev WI. *Xanthophyllomyces* Golubev. In *The Yeasts* (Fourth Edition) 1998(pp. 718-719).
27. Nahvi I, Vaez M, Emtiazi G. Evaluation of carotenoid-producing yeasts associated with birch trees (*Betula pendula*) in the North of Iran-Shahrestanak village. *Pajouhesh-va-Sazandegi*. 2000; 13(3):70-74. [In Persian]
28. Weber RW, Davoli P, Anke H. A microbial consortium involving the astaxanthin producer *Xanthophyllomyces dendrorhous* on freshly cut birch stumps in Germany. *Mycologist*. 2006 May 1;20(2):57-61.
29. Libkind D, Moliné M, de García V, Fontenla S, van Broock M. Characterization of a novel South American population of the astaxanthin producing yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2008 Mar 1;35(3):151-8.

30. Colabella F, Libkind D. PCR-based method for the rapid identification of astaxanthin-accumulating yeasts (*Phaffia* spp.). *Revista Argentina de Microbiología*. 2016 Jan 1;48(1):15-20.
31. Muir A, Harrison E, Wheals A. A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. *FEMS yeast research*. 2011 Nov 1;11(7):552-63.
32. Glushakova AM, Chernov IY. Seasonal dynamics in a yeast population on leaves of the common wood sorrel *Oxalis acetosella* L. *Microbiology*. 2004 Mar 1;73(2):184-8.
33. Gilbert DG. Dispersal of yeasts and bacteria by *Drosophila* in a temperate forest. *Oecologia*. 1980 Jul 1;46(1):135-7.
34. Mittelbach M, Yurkov AM, Nocentini D, Nepi M, Weigend M, Begerow D. Nectar sugars and bird visitation define a floral niche for basidiomycetous yeast on the Canary Islands. *BMC ecology*. 2015 Dec;15(1):2.