مجله دنیای میکروب‌ها
سال دوازدهم شماره دوم (پیاپی ۳۹) تابستان ۱۳۹۸
صفحات ۱۴۹-۱۳۹

Original Article

جداسازی و شناسایی مولکولی مخمرهای کاروتنوئیدی تراوشات درختان توس منطقه مارمیشو در شمال غرب ایران

فائزه اجرلو[۱]، محسن واعظ[۲*]، جعفر همت[۲]

[۱]دانشجوی دکتری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری، [۲] استادیار، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری.

چکیده

سابقه و هدف: بخشی از تنوع زیستی و گوناگونی حیات در زیست بوم‌های مختلف کره زمین، متعلق به مخمرها می باشد. به دلیل اهمیت اقتصادی مخمرهای کاروتنوئیدی، زیستگاه‌های طبیعی و خاص آنها نیز مورد توجه است. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی مخمرهای کاروتنوئیدی تراوشات درختان کمیاب توس در منطقه مارمیشو در شمال غرب ایران اجرا گردید.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به صورت مقطعی با نمونه‌برداری از یکی از رویشگاه‌های طبیعی درختان توس گونه *بتولا پندولا* در شمال غرب ایران، استان آذربایجان غربی صورت پذیرفت. با استفاده از محیط کشت انتخابی اقدام به جداسازی مخمرها گردید. غربالگری کلنی ها برای مدت یک ماه از نظر شکل و رنگ صورتی تا قرمز صورت گرفت. در نهایت بخش D1/D2 ریبوزومی برای ۱۹ جدایه تعیین ترادف گردید.

یافته‌ها: از ٤٥ سویه مخمری جداسازی شده واجد رنگدانه صورتی- قرمز، ژن ریبوزومی برای ۱۹ جدایه توالی یابی شد. مخمرهای کاروتنوئیدی از نظر فیلوژنتیک در دسته *بازیدیومایکوتا* مشتمل بر جنس‌های *ردوتورولا*، *سیستوبازیدیوم*، *سیستوفیلوبازیدیوم*، *گزانتوفیلومایسس*، *یوستیلنتیلوما* و *رودوسپریدیوم* قرار گرفتند.

نتیجه گیری: الگوی منحصر به فرد اجتماع مخمرهای کاروتنوئیدی شکل گرفته در این کنام اکولوژیکی و قرار گرفتن جدایه ها با میزان تولید متفاوت رنگدانه در ٦ جنس با توان بیوسنتز ساختارهای مختلف کاروتنوئیدی، نشان دهنده تنوع و غنای بالای اکوسیستم تراوشات درختان توس منطقه مارمیشو از نظر این گروه مخمرها است. این مطالعه اولین گزارش از تنوع مخمرهای کاروتنوئیدی در شمال غرب ایران می باشد و اجتماع متمایز سویه های مخمری بومی این زیستگاه را ارایه می نماید.

واژگان کلیدی: مخمر، رنگدانه های کاروتنوئیدی، آستاگزانتین، تنوع زیستی، درختان توس منطقه مارمیشو.

دریافت مقاله: آبان ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۷

مقدمه

میکروارگانیسم ها سهم قابل توجهی از تولید زیستی رنگدانه های کاروتنوئیدی در طبیعت را دارا می باشند. تاکنون بیش از ۱۱۰۰ ساختار متفاوت کاروتنوئیدی از بیش از ٦۰۰ منبع حیاتی در سه قلمرو یوکاریوتی، آرکی ها و باکتری ها گزارش شده است (۱). این ترکیبات یکی از رایج ترین رنگدانه ها در طبیعت بوده و نقش زیستی مهمی را در

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری
تلفن: ۰۲۱۵٦۲۷٦۰۲۰ پست الکترونیک: mvaez@irost.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

موجودات ایفا می نمایند. فعالیت زیستی مشابه با ویتامین آ برای بیش از ۵۰ مورد از این ترکیبات گزارش شده است. بر خلاف گیاهان و برخی میکروارگانیسم ها (به ویژه مخمرها)، جانوران و انسان قادر به سنتز کاروتنوئیدها نبوده و لازم است این ترکیبات به منظور ایفای نقش بیولوژیک، به جیره غذایی آنها اضافه شوند (۲ و ۳).

مخمرها میکرواگانیسم های یوکاریوتی و بخشی از فرمانروی قارچ ها می باشند که تکثیر آنها در فاز تولیدمثل غیر جنسی به طریق جوانه زدن و شکافت بوده و فاز جنسی آنها درون یا بر روی اجسام میوه ای، شکل نمی گیرد (٤). از سال ۲۰۱۳ و با اجرای قانون بین المللی نامگذاری "یک قارچ، یک نام" و به منظور رده بندی دقیق تر، اشکال غیرجنسی و جنسی مخمرها که گاه به طور مترادف بیان می گردیدند کاملاً از یکدیگر تفکیک شده اند (۵ و ٦). مخمرها با ایفای نقش در زنجیره غذایی به عنوان تجزیه کنندگان اولیه حائز اهمیت بوده و به لحاظ دارا بودن مسیرهای متابولیتی ویژه بیوسنتزی می توانند الگوی پراکنش وسیعی داشته و زیستگاه های متفاوتی را در بر گیرند (۷). بسیاری از مخمرها در زنجیره غذایی اکوسیستم ها به عنوان تجزیه کنندگان اولیه نقش بازی می کنند. به طور معمول مخمرهای آزادزی، اولین اجتماعات را بر روی مواد سرشار از ترکیبات تغذیه ای شکل می دهند و علاوه بر تجزیه مواد آلی بی جان، سبب در اختیار قرار گرفتن متابولیت های حاصله برای سایر موجودات به شکل روابط همسفرگی، انگلی، بیماری زایی و همزیستی می گردند (۷ و ۸).

بنابراین مخمرها در تمامی زیست بوم ها بشکل گسترده پراکنده اند و از سطوح بالا در میان ابرهای ناحیه استراتسفر تا عمیق ترین بخش های اقیانوس ها، دریاها و یخچال های قطب شمال و جنوب وجود دارند (۹ و ۱۰). با در نظر گرفتن بخش وسیعی از قلمروهای بکر موجود بر روی کره زمین پیش بینی می گردد تاکنون تنها ۱٪ از کل مخمرها شناسایی گردیده اند (۱۱). تراوشات گیاهی عموما محیطی سرشار از مواد مغذی و املاح برای رشد میکروارگانیسم ها از جمله مخمرها هستند و گزارشات فراوانی در خصوص جداسازی مخمرها از بخش های مختلف گیاهان ارایه شده است (۱۲ و ۱۳). از طرفی مطالعه اندکی در مورد گونه های درختان توس یا غان (*Betula* spp.) و تراوشات آنها وجود دارد (۱٤ و ۱۵).

درختان توس نقره ای (*Betula pendula* Roth.) به ویژه درختان برگ ریز مناطق سردسیر هستند که رویشگاه های آن در ایران به چند ناحیه کوچک در شمال و شمال غرب محدود شده اند (۱٦). در شمال غرب کشور، تنها رویشگاه درخت توس نقره ای (Silver birch) در منطقه مارمیشو در آذربایجان غربی در بین دره‌هایی به وسعت حدود ۱۸٤ کیلومتر مربع در فاصله ۷۰ کیلومتری شمال غربی شهرستان ارومیه گزارش شده است. درختان توس این منطقه پراکنش لکه ای و پراکنده داشته و در طول جغرافیایی ٤٤°۳۵′ و عرض جغرافیایی ۳۷° ۳٤′ در ارتفاع ۱۷٤۱ متر از سطح دریا واقع شده اند (۱۷).

حضور ترکیبات منحصر به فرد در این تراوشات در برابر تابش اشعه ماورای بنفش ایجاد رادیکال های آزاد نموده و محیطی انتخابی برای میکروارگانیسم های مقاوم به تنش های اکسیداتیو ایجاد می نماید. توان تولید ترکیبات کاروتنوئیدی به میکروارگانیسم ها از جمله مخمرها امکان سازگاری با محیط و خنثی نمودن رادیکال های آزاد را داده و تجمع این گروه از میکروارگانیسم ها به منظور رشد و استفاده از مواد مغذی تراوشات گیاهی را در یک محیط رقابتی فراهم می سازد. شرایط انتخابی حاکم در این نوع کنام (niche) اکولوژیکی موجب می شود تنوع میکروبی غالب محدود به مخمرهای مولد ساختارهای کاروتنوئیدی خاص مانند آستاگزانتین در جنس های *فافیا* و *گزانتوفیلومایسس* یا سویه های با توان تولید بالا به منظور مقابله با تنش های اکسیداتیو موجود در تراوشات گردد (۲۰-۱۸).

هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی مخمرهای کاروتنوئیدی تراوشات درختان توس با استفاده از بخشD1/D2 زیر واحد بزرگ ریبوزومی مخمرهای مولد رنگدانه بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری: شیره تراوش شده طبیعی درختان توس

منطقه مارمیشو در آذربایجان غربی در شرایط سترون با استفاده از سمپلر و پیپت پاستور نمونه برداری گردید. کشت نمونه ها به دو شکل مستقیم در محل و نیز بعد ازانتقال به آزمایشگاه در کوتاهترین زمان ممکن بر روی یخ صورت پذیرفت. نمونه برداری دراردیبهشت سال ۱۳۹۶ انجام گرفت و حداکثر دمای روزانه منطقه هنگام نمونه برداری ۱۸ درجه سلیسیوس ثبت گردید.

ب) کشت و جداسازی مخمرها: نمونه ها با و بدون تهیه رقت در سه تکرار بر روی محیط کشت ییست مولد آگار YM (Yeast Mold Agar) شرکت دیفکو (Difco) آمریکا با تنظیم pH ۳/۵ جهت مهار رشد باکتری ها و کاستن از رشد میسلیوم های قارچی همراه با آنتی بیوتیک ضدباکتریایی کلرامفنیکل با استفاده از میله شیشه ای سرکج کشت داده شدند. پلیت های تلقیح شده، برای مدت یک هفته تا یک ماه بسته به میزان تراکم کلنی های مخمری و سایر قارچ ها در دمای ۱۸ درجه سلیسیوس نگهداری شدند. در این مدت و در صورت حضور میسلیوم های قارچی با رشد لجام گسیخته، اقدام به سوزاندن آنها گردید. (٤ و ۲۱). به منظور جداسازی و غربالگری بیشتر کلنی های رنگی به سبب افزایش تولید رنگدانه کاروتنوئیدی در دمای پایین و مهار رشد میسلیوم های قارچی، پلیت های کشت برای مدت طولانی تر در دمای یخچال (۱۰-٦ درجه سلسیوس) نگهداری، بررسی و خالص‌سازی شد (۲۲ و ۲۳).

ج) غربالگری اولیه جدایه ها: رنگ صورتی تا قرمز به عنوان یکی از شاخص های مهم درمراحل اولیه گزینش مد نظر قرارگرفت. کلنی مخمرها باتوجه به خصوصیات ظاهری (رنگ و میزان آن، شکل، قوام، اندازه، حاشیه و وجود برآمدگی سطحی) جداسازی و خالص سازی گردید. همچنین برخی خصوصیات اولیه ماکروسکوپی (تولید بالیستوسپور)، بیوشیمیایی (تخمیر قند گلوکز به روش لوله دورهام، مصرف هوازی قند لاکتوز، رشد در حضور غلظت های مختلف قند گلوکز، اتانل و سیکلوهگزامید و دماهای مختلف ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلیسیوس) و میکروسکوپی (تولید هیف کاذب) در فرایند گزینش اولیه استفاده گردید (٤). حضور و عدم حضور رنگدانه کاروتنوئیدی نیز طی یک آزمون ساده و سریع انجام شد (۲٤).

د) شناسایی مولکولی و ترسیم درخت فیلوژنتیک: استخراج DNA سویه ها با روش سامپایو (Sampaio) و همکاران (۲۰۰۱) صورت گرفت (۲۵) و میزان کمی و کیفی آن توسط دستگاه نانودراپ ساخت شرکت بیوتک آمریکا مشخص گردید. به منظور تکثیر ترادف حدود ٦۰۰ جفت بازی بخش D1/D2 زیر واحد بزرگ ریبوزومی از پرایمرهای F63: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG–3' و LR3: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG –3' استفاده شد (۲٦ و ۲۷).

واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر مشتمل بر ۱/۵ میکرومولار $MgCl_2$، ۰/۲ میکرومولار از هر کدام یک از dNTPها، ۰/۰٤ میکرومولار از هر یک از پرایمرها و ۱/۲۵ واحد آنزیم *Taq* DNA پلی مراز در بافر با غلظت نهایی 1X و میزان مناسب DNA الگو تهیه گردید. در کنترل منفی، از آب مقطر به جای DNA استفاده شد. برنامه دمایی انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز شامل یک چرخه ۳ دقیقه ای در ۹۵ درجه سلیسیوس، ۳۵ چرخه مشتمل بر ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلیسیوس، ٦۰ ثانیه در ۵٦ درجه سلیسیوس و ٦۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلیسیوس و نهایتاً یک چرخه ۷۲ درجه سلیسیوس برای ۵ دقیقه دردستگاه ترموسایکلر پالم سایکلر (Palm Cycler) ساخت کشور هند انجام شد (۳۱). محصول واکنش زنجیره ای پلی‌مراز بر روی ژل ۱٪ آگارز الکتروفورز مشاهده گردید و محصول به دست آمده در نهایت جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید.

ه) آنالیزهای آماری: نتایج خوانش توسط نرم افزار پروسک (ProSeq) نسخه ۲/۹۱ بررسی و ویرایش گردید (۲۸). با به کارگیری نرم افزار بلاست و مقایسه میزان تشابه توالی های خوانش شده نمونه ها با توالی های ثبت شده در پایگاه داده های اطلاعات ژنومی NCBI میزان مطابقت با سویه های استاندارد تعیین گردید (۲۹). تعیین روابط فیلوژنی با استفاده از نرم افزار DNAMAN نسخه ۵.۲.۱۰ مشخص گردید (۳۰).

شکل ۱: کلنی های رنگی برخی از جدایه های گزینش شده از سویه های مخمری مولد رنگدانه صورتی تا قرمز. ۵-۱) مخمرهای جنس های کاروتنوئیدی؛ ۸- ٦) مخمرهای جنس های غیر کاروتنوئیدی.

یافته‌ها

تفکیک اولیه جدایه ها بر اساس ویژگی های ریخت شناختی کلنی ها و برخی مشخصات فیزیولوژیک انجام گردید. از مجموع ٤٥ جدایه، تعداد ۱۹ سویه با رنگ های مختلف صورتی، نارنجی، قرمز با توجه به تنوع رنگ و شکل کلنی گزینش اولیه شدند (شکل ۱). بر اساس ترادف یابی بخش های D1/D2 ژن زیر واحد بزرگ ریبوزومی، ۱۹ جدایه منتخب دارای کلنی صورتی تا قرمز به شرح جدول ۱ شناسایی مولکولی گردیدند. درخت فیلوژنتیک جدایه های دارای کلنی صورتی تا قرمز به روش Maximum likelihood و ضریب Bootstrap صد با استفاده از نرم افزار DNAMAN رسم گردید (۳۰).

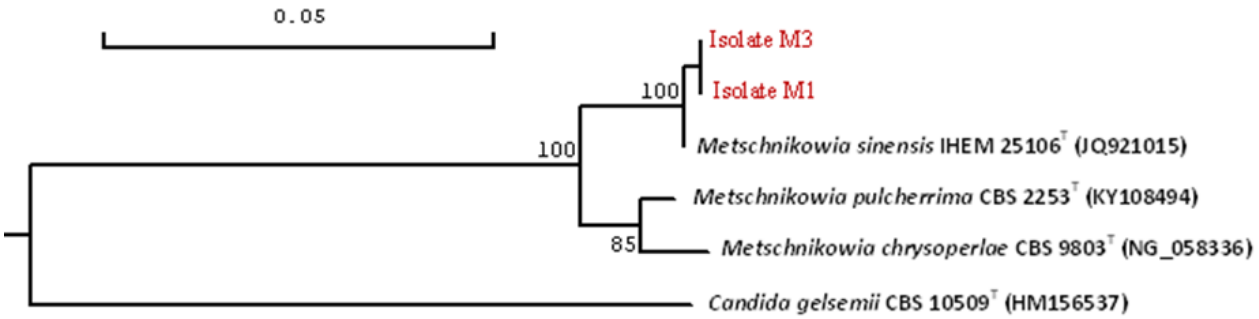
درخت فیلوژنتیکی توالی ژنی ریبوزومی به تفکیک برای دسته آسکومایکوتا و بازیدیومایکوتا در شکل ۲ و ۳ آورده شده است.

جدول ۱: جدایه های منتخب و نزدیک ترین سویه های مرجع.

ردیف	جدایه	سویه مرجع با بیشترین تطابق	درصد تشابه	رنگدانه
۱	M4	*Cystofilobasidium macerans* CBS 2425^T	۱۰۰	کاروتنوئیدی
۲	M4A	*Cystofilobasidium macerans* CBS 2425^T	۱۰۰	کاروتنوئیدی
۳	M6	*Cystofilobasidium macerans* CBS 2425^T	۱۰۰	کاروتنوئیدی
٤	M7	*Rhodosporidiobolus colostri* CBS 2201^T	۹۹/۵	کاروتنوئیدی
٥	M8	*Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316^T	۱۰۰	کاروتنوئیدی
٦	M10	*Xanthophyllomyces dendrorhous* CBS 6938^T	۹۹/۷	کاروتنوئیدی
۷	M11	*Cystobasidium pinicola* CBS 9130^T	۹۹/۲	کاروتنوئیدی
۸	M11A	*Cystobasidium pinicola* CBS 9130T	۹۹/۲	کاروتنوئیدی
۹	M12	*Ustilentyloma graminis* CBS 2826^T	۹۹/۸	کاروتنوئیدی
۱۰	M12A	*Ustilentyloma graminis* CBS 2826^T	۹۹/۸	کاروتنوئیدی
۱۱	M13	*Rhodotorula glutinis* CBS 20^T	۱۰۰	کاروتنوئیدی
۱۲	M14	*Rhodosporidiobolus colostri* CBS 2201^T	۹۹/۵	کاروتنوئیدی
۱۳	M15	*Cystobasidium sp.*_CBS 8923^T	۹۹/۸	کاروتنوئیدی
۱٤	M18	*Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316^T	۱۰۰	کاروتنوئیدی
۱٥	M18b	*Rhodotorula mucilaginosa* CBS 316^T	۱۰۰	کاروتنوئیدی
۱٦	M1	*Metschnikowia pulcherrima*_IHEM 25106^T	۹۹/۱	غیرکاروتنوئیدی
۱۷	M2S	*Vishniacozyma carnescens* CBS 973^T	۹۹	غیرکاروتنوئیدی
۱۸	M2L	*Vishniacozyma carnescens* CBS 973^T	۹۹/۳	غیرکاروتنوئیدی
۱۹	M3	*Metschnikowia sinensis* IHEM 25106^T	۹۹/۱	غیرکاروتنوئیدی

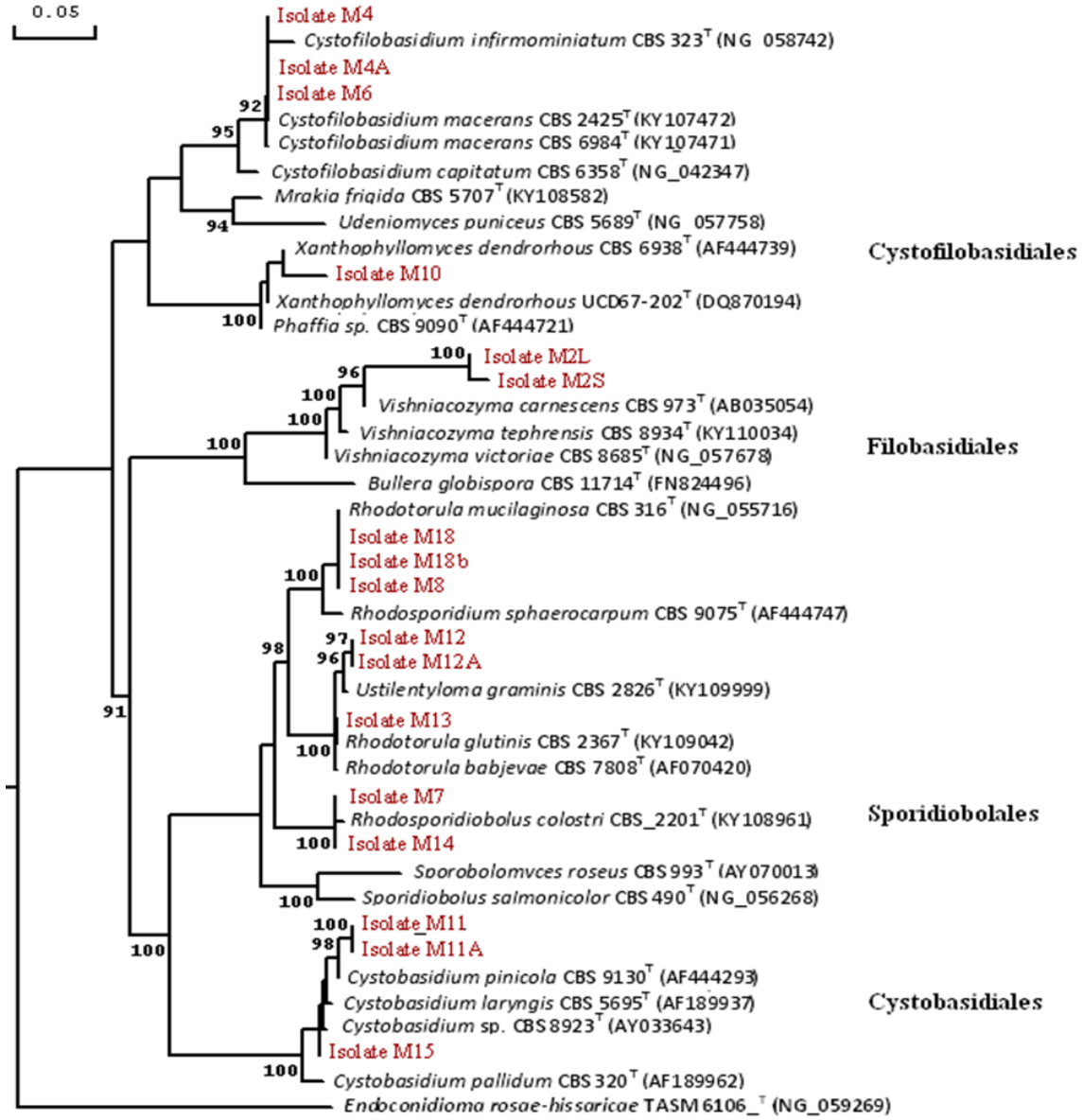
بحث

اجتماع مخمری تراوشات درختان توس تحت تاثیر عوامل



شکل ۲: درخت فیلوژنتیک مربوط به بخش D1/D2 زیر واحد بزرگ ریبوزومی جدایه های شاخه آسکومایکوتا با استفاده از روش Maximum likelihood و ضریب Bootstrap صد. نتایج بیانگر قرار گرفتن دو جدایه با کلنی صورتی در بین گونه های جنس *مچنیکوویا* می باشد. مخمر *کاندیدا ژلسمی* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است. طول شاخه ها، نسبتی از تفاوت نوکلئوتیدی بر مبنای مقیاس نشان داده شده می باشد. شماره های درج شده در هر گره، درصد احتمال ظاهر شدن هر کدام از شاخه ها طی صد تکرار Bootstrap است.

مختلف زیستی و غیر زیستی و ترکیبات موجود در این تراوشات است و الگوی پراکنش، انتقال، سازگاری و بقای مخمرها در این زیستگاه را شکل می دهد (۳۱). ترکیبات شیره درختان توس در مجاورت تابش نور خورشید ایجاد رادیکال های آزاد و اکسیژن نوزاد می نماید که سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در این تراوشات و مهار رشد مخمرها می گردد (۲۰-۱۸). این پدیده با تابش نور فرابنفش به ماده رزبنگال (Rose Bengal) در محیط کشت آزمایشگاهی شبیه سازی و مطالعه گردیده است (۱۹). ترکیبات کاروتنوئیدی با خواص ضد اکسیدانتی خود قادر به مهار تنش اکسیداتیو بوجود آمده در تراوشات درختان توس هستند. گرچه مخمرهای کاروتنوئیدی به طور طبیعی قادر به تولید این ترکیبات بوده لیکن میزان بقا و غنای گونه ای این گروه از مخمرها بسته به توان و نوع ساختار کاروتنوئیدی تولیدی است (۱۹).



شکل ۳: درخت فیلوژنتیک مربوط به بخش D1/D2 زیر واحد بزرگ ریبوزومی جدایه های شاخه بازیدیومایکوتا با استفاده از روش Maximum likelihood و ضریب Bootstrap صد. نتایج بیانگر قرار گرفتن جدایه ها در ٦ جنس مخمری با توان تولید ساختارهای متنوع کاروتنوئیدی از جمله مخمر *گزانتوفیلومایسس دندوروس* تولید کننده کاروتنوئید آستاگزانین می باشد. قارچ *اندوکونیدیوما رزا-هیساریکا* بعنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است. طول شاخه ها، نسبتی از تفاوت نوکلئوتیدی بر مبنای مقیاس نشان داده شده می باشد. شماره های درج شده در هر گره، درصد احتمال ظاهر شدن هر کدام از شاخه ها طی صد تکرار Bootstrap است.

این عامل اکسیداتیو همراه با شرایط آب و هوایی باعث گردیده که اجتماعات مخمری با الگوی منحصر بفرد، مختص آن کنام اکولوژیکی و متمایز از سایر مناطق دنیا شکل گیرد.

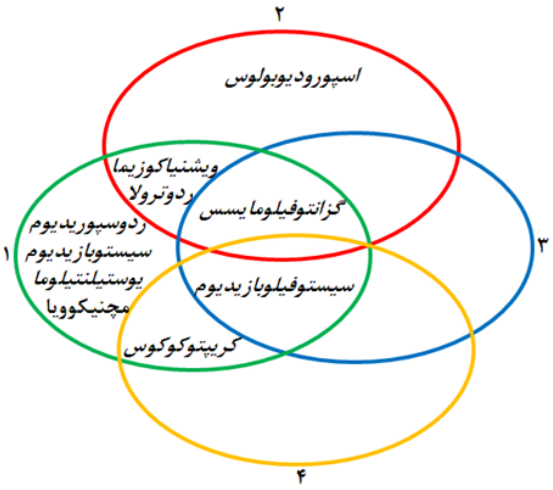
در این پژوهش اقدام به مطالعه تنوع مخمری کاروتنوئیدی تراوشات درختان توس زیستگاه بکر منطقه مارمیشو گردید. استفاده از محیط های انتخابی امکان رشد مخمرهای قابل کشت را فراهم نمود. گام اول در غربالگری مخمرهای مولد کاروتنوئید، رنگ و ریخت شناسی کلنی آنهاست. با این وجود همه مخمر های مولد رنگدانه صورتی تا قرمز از نوع کاروتنوئیدی نیستند و در دو گروه غیر کاروتنوئیدی و کاروتنوئیدی تقسیم بندی می‌شوند که تفکیک آنها با یک آزمون ساده و اولیه امکان پذیر شد. مخمرهای مولد رنگدانه غیرکاروتنوئیدی در برخی جنس های *بورلا* (*Burella*)، *کاندیدا* (*Candida*)، *کریپتوکوکوس* (*Cryptococcus*)، *کلیورومایسس* (*Kluyveromyces*)، *ویشنیاکوزیما* (*Vishniacozyma*)، *استریگماتومایسس* (*Sterigmatomyces*) و *مچنیکوویا* (*Metschnikowia*) گزارش شده اند (٤).

از طرفی اکثر گونه های کاروتنوئیدی در جنس های *ردوتورولا* (*Rhodotrula*)، *سیستوبازیدیوم* (*Cystobasidium*)، *سیستوفیلوبازیدیوم* (*Cystofilobasidium*)، *ردوسپوریدیوم* (*Rodosporidium*)، *یوستیلنتیلوما* (*Ustilentyloma*) *اسپورودیوبولوس* (*Sporidiobolus*)، *اسپوروبولومایسس* (*Sporobolomyces*) و *گزانتوفیلومایسس* (*Xanthophyllomyces*) قرار می گیرند (٤). این گروه شامل گونه های متنوع از لحاظ توان تولید و نوع ساختار کاروتنوئید می باشد. علاوه بر میزان تولید، نوع ساختار کاروتنوئیدی در مخمرها نیز با قرابت فیلوژنتیکی آنهادر ارتباط است.

بازینی (Buzzini) و همکاران در سال ۲۰۰۷ اقدام به مطالعه مشخصات کاروتنوئیدی جنس های *ردوتورولا*، *ردوسپوریدیوم*، *اسپوروبولومایسس* و *اسپورودیوبولوس* نمودند و نشان دادند که تفاوت قابل توجهی در نوع کاروتنوئید های تولید شده توسط این جنس های مخمری وجود دارد (۳۲). این مطالعه به عنوان یکی از معدود مطالعات نشان داد که تفاوت موجود در نوع ساختار کاروتنوئیدی با قرابت فیلوژنی مخمرها در ارتباط است و جنس های با فاصله فیلوژنی بیشتر دارای تفاوت بیشتر در نوع ساختار کاروتنوئیدی هستند که می توان به جنس های *ردوترلا* با *اسپوروبولومایسس* اشاره نمود (۳۲).

در سال ۲۰۰۹ فرنگوا (Frengova) و همکاران، کاروتنوئیدهای دو جنس مخمری *ردوترولا* و *فافیا* که در زیست فناوری حائز اهمیت اند را مورد مطالعه قرار دادند (۳۳). از لحاظ ساختار، برخی کاروتنوئید ها دارای خواص ضد اکسیدانتی قوی تر هستند که در پراکنش و میزان بقای مخمرها موثراند. به عنوان نمونه کاروتنوئید تورولارودین (torularhodin) مخمر *ردوترولا گلوتینیس* (*Rhodotorula glutinis*) دارای خاصیت مهار کننده رادیکال های فعال و اکسیژن نوزاد بیشتری نسبت به بتاکاروتن (β-carotene) است (۳۲). کاروتنوئید آستاگزانتین (astaxanthin) یک آنتی اکسیدانت قوی است که تنها توسط گونه های مخمری *فافیا ردوزیما* و *گزانتوفیلومایسس دندروروس* تولید می گردد. به همین دلیل این دو مخمر توانایی مهار تنش های اکسیداتیو موجود در تراوشات درختان توس را دارند و این کنام اکولوژیکی به عنوان یکی از زیستگاه های خاص این مخمرهای نادر گزارش شده است (۲۹).

مطالعات و گزارش های محدودی از تنوع مخمری تراوشات درختان توس در بخش های مختلف دنیا ارائه شده است. در سال ۱۹۹۸ گلوبو (Globev) از درختان توس مسکو ضمن بررسی تنوع مخمری، به حضور مخمرهای مولد کاروتنوئید ازجمله *گزانتوفیلومایسس دندروروس* اشاره نموده است (۳٤). در آگوست ۲۰۰۰ در یک مطالعه مقطعی توسط نحوی (Nahvi) و همکاران بررسی تنوع میکروبی مخمرهای مولد کاروتنوئید به روش شناسایی غیرمولکولی صورت گرفت و با وجود برخی نتایج مشابه با سایر محققین، از جمله گونه های جنس های *ردوتورولا* و *ردوسپوریدیوم*، مخمر *گزانتوفیلومایسس دندروروس*، گونه های جنس *دیوزگیا*، *اسپورودیوبولوس*، *اسپوروبولومایسس* به علل مختلف از جمله دمای بالای منطقه گزارش نگردید (۳۵).



شکل ٤: جنس های مخمری دارای کلنی صورتی – قرمز جدا شده از تراوشات درختان توس برخی مناطق دنیا ۱) مطالعه حاضر ۲) درختان توس شهر مسکو روسیه ۳) درختان توس شهر کایزرسلاوترن آلمان ٤) درختان توس شهر مودنا ایتالیا (١٤).

در مطالعه وبر (Weber) و همکاران در سال ۲۰۰٦، جداسازی مخمر *گزانتوفیلومایسس دندروروس* از درختان توس شهر مودنا ایتالیا ممکن نگردید که دلیل احتمالی آن را دمای بالای منطقه نمونه برداری عنوان نمودند (٣٦).

در سال ۲۰۰٦ وبر (Weber) و داولی (Davoli) اجتماعی از مخمرهای قرمز از جنس های مخمری کاروتنوئیدی *سیستوفیلوبازیدیوم* و *گزانتوفیلومایسس دندروروس* را گزارش نمودند (٣٧). تفاوت موجود در گونه های مخمری کاروتنوئیدی در جدایه های ارایه شده توسط محققین مختلف بیانگر آن است که علاوه بر ترکیبات موجود در این کنام اکولوژیکی و عوامل انتقال دهنده مخمرها همچون حشرات و پرندگان، ، شرایط آب و هوایی نیز نقش مهمی در شکل گیری این تجمعات دارد و الگوی جمعیتی منحصر بفرد و متمایزی را شکل می دهند (٣٨ و ٣٩).

به عبارتی اجتماعات مخمری درختان توس مناطق مختلف دنیا به ویژه ایران علاوه بر وجوه مشترک دارای شاخص های منحصر بفردی هستند (شکل ٤).

مطالعه ما نشان داد که مخمرهای جداسازی و شناسایی شده، در ٦ جنس مخمری قرار گرفته اند که در توان تولید (بر پایه رنگ کلنی) و نوع ساختار کاروتنوئیدی (بر پایه نتایج مولکولی) تنوع بالایی را شامل می گردند که در این کنام اکولوژیکی با الگوی خاص این منطقه شکل گرفته است. برخی سویه های جنس *ردوسپوریدیوم* با وجود تشابه کامل ترادف ژن ریبوزومی (جدول ۱)، از نظر رنگ کلنی و توان تولید کاملا متمایز بوده که نیازمند بررسی سیر تکاملی و عوامل محیطی موثر بر ژن های مسیرهای بیوسنتز کاروتنوئیدها در سویه های نزدیک می باشد. این مطالعه اولین گزارش از الگوی پراکنش سویه های بومی مخمرهای کاروتنوئیدی در این کنام اکولوژیکی در معرض خطر محسوب گردیده که طی سالیان متمادی در شرایط اکوسیتمی خاص منطقه شکل گرفته اند.

نتیجه گیری

در این مطالعه مخمرهای مولد رنگدانه صورتی تا قرمز تراوشات درختان توس منطقه مارمیشو به روش وابسته به کشت جداسازی شدند. این جدایه ها عمدتا از دسته بازیدیومایکوتا و از گروه کاروتنوئیدی می باشند. شناسایی مولکولی و بررسی فیلوژنی آنها بر اساس بخش D1/D2 زیرواحد بزرگ ریبوزمی انجام گردید. نتایج بیانگر حضور جنس های متنوع مخمرهای کاروتنوئیدی از جمله مخمر *گزانتوفیلومایسس دندروروس* مولد کاروتنوئید آستاگزانتین می باشد. علاوه بر ناقلین مخمرها، ترکیبات خاص موجود در تراوشات درختان توس، شرایط زیست محیطی خاص این منطقه تراوشات این گیاه را میزبان و کنام اکولوژیکی برای شکل گیری اجتماع متمایز و منحصر بفرد این دسته از میکروارگانیسم ها ساخته است. این تحقیق ضمن معرفی تنوع مخمری کاروتنوئیدی بومی شکل گرفته در این اکوسیستم در معرض خطر، امکان بررسی ارتباط عوامل موثر بر الگوی اجتماع مخمری شکل گرفته و سیر تکاملی مسیرهای سنتز زیستی کاروتنوئیدی در جنس های با قرابت دور یا نزدیک را فراهم می نماید.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از سرکار خانم مهندس لارتی در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی و راهنمایی در خصوص رویشگاه درختان توس منطقه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد

References

1. Yabuzaki J. Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. Database Oxford. 2017; 3(1): 1-11.
2. Mata-Gómez LC, Montañez JC, Méndez-Zavala A, Aguilar CN. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. Microb Cell Fact. 2014; 13(1): 1-11.
3. Mannazzu I, Landolfo S, Da Silva TL, Buzzini P. Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest. World J Microbiol Biotechnol. 2015; 31(11): 1665-1673.
4. Kurtzman C, Fell JW. The yeasts: a taxonomic study. 4th edition. Elsevier; 1998.
5. Hibbett DS, Taylor JW. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand?. Nat Rev Microbiol. 2013; 11(2): 129-133.
6. Vu D, Groenewald M, Szöke S, Cardinali G, Eberhardt U, Stielow B, de Vries M, Verkleij GJ, Crous PW, Boekhout T, Robert V. DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. Stud Mycol. 2016; 85(1): 91-105.
7. Rosa CA, Péter G. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. 1st edition. Springer, Berlin, Heidelberg; 2006.
8. Buzzini P, Lachance M, Andre, Yurkov, A. Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology. 1st edition. Springer, Cham.; 2017.
9. Butinar L, Spencer-Martins I, Gunde-Cimerman N. Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. Anton Leeuw Int J G. 2007; 91(3): 277-289.
10. Starmer WT, Fell YW, Catranis CM, Aberdeen V, Ma LJ, Zhou S, Rogers SO. Yeasts in the genus *Rhodotorula* recovered from the Greenland ice sheet. Life in ancient ice. 1st edition; 2005.
11. Boekhout T. Biodiversity: gut feeling for yeasts. Nature. 2005; 434(7032):449-450.
12. Péter G, Tornai-Lehoczki J, Dlauchy D. *Ogataeapopulialbae* sp. nov., a yeast species from white poplar. FEMS Yeast Res. 2009; 9(6): 936-941.
13. de Vega C, Albaladejo RG, Guzmán B, Steenhuisen SL, Johnson SD, Herrera CM, Lachance MA. Flowers as a reservoir of yeast diversity: description of *Wickerhamiella nectarea* fa sp. nov., and

Wickerhamiella natalensis fa sp. nov. from South African flowers and pollinators, and transfer of related *Candida* species to the genus *Wickerhamiella* as new combinations. FEMS Yeast Res. 2017; 17(5): 1-11.

14. Weber RW. On the ecology of fungal consortia of spring sap-flows. Mycologist. 2006; 20(4): 140-143.

15. Grabek-Lejko D, Kasprzyk I, Zaguła G, Puchalski C. The bioactive and mineral compounds in birch sap collected in different types of habitats. Balt For. 2017; 23(2): 394-401.

16. 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. Iran J Biol. 2015; 28(2): 191-201.

17. Larti M. Gasempoor S. Maassoumi A. Trees and shrubs in Marmisho area in West Azarbaijan. Iran J Biol. 2011; 24(1): 104-109.

18. Polle A, Rennenberg H. Field studies on Norway spruce trees at high altitudes: II. Defense systems against oxidative stress in needles. New Phytol. 1992; 121(4): 635-642.

19. Schroeder WA, Johnson EA. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. J Ind Microbiol Biotechnol. 1995; 14(6): 502-507.

20. Moliné M, Libkind D, del Carmen Diéguez M, van Broock M. Photoprotective role of carotenoids in yeasts: response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. J Photochem Photobiol B. 2009; 95(3): 156-161.

21. Yurkov A, Wehde T, Kahl T, Begerow D. Aboveground deadwood deposition supports development of soil yeasts. Diversity. 2012; 4(4): 453-474.

22. Arthur HE, Watson KE. Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. J Bacteriol. 1976; 128(1): 56-68.

23. Bhosale P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. J Microbiol Biotechnol. 2004; 63(4): 351-361.

24. Mrak EM, Phaff HJ, Mackinney G. A simple test for carotenoid pigments in yeasts. J Bacteriol. 1949; 57(4): 409-411.

25. Sampaio JP, Gadanho M, Santos S, Duarte FL, Pais C, Fonseca A, Fell JW. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51(2): 687-697.

26. Scorzetti G, Fell JW, Fonseca A, Statzell-Tallman A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. FEMS Yeast

Res. 2002; 2(4): 495-517.

27. 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. Int J Syst Evol Microbiol. 2000; 50(3): 1351-1371.

28. Filatov DA. ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. Mol Ecol Notes. 2002; 2(4): 621-644.

29. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990; 215(3): 403-410.

30. Woffelman C. DNAMAN for Windows, Version 5.2. 10. Lynon Biosoft. Institute of Molecular Plant Sciences, Netherlands: Leiden University. 2004.

31. Gilbert DG. Dispersal of yeasts and bacteria by Drosophila in a temperate forest. Oecologia. 1980; 46(1): 135-137.

32. Buzzini P, Innocenti M, Turchetti B, Libkind D, van Broock M, Mulinacci N. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. Can J Microbiol. 2007; 53(8): 1024-1031.

33. Frengova GI, Beshkova DM. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009; 36(2): 163.

34. Golubev VI, Bab'eva IP, Novik SN. Yeast succession in birch sap flows. Sov J Ecol. 1977; 8: 399-403.

35. 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].

36. Weber RW, Davoli P. *Xanthophyllomyces* and other red yeasts in microbial consortia on spring sap-flow in the Modena province (Northern Italy). Atti Soc Nat Mat Modena. 2005; 136(2): 127-135.

37. Weber RW, Davoli P, Anke H. A microbial consortium involving the astaxanthin producer *Xanthophyllomyces dendrorhous* on freshly cut birch stumps in Germany. Mycologist. 2006; 20(2): 57-61.

38. 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 Ecol. 2015; 15(1): 1-13.

39. Glushakova AM, Chernov IY. Seasonal dynamics in a yeast population on leaves of the common wood sorrel *Oxalis acetosella* L. Microbiology (Moscow). 2004; 73(2): 184-188.

Journal of Microbial World
Volume 12, No. 2, July 2019

Original Article

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

Faezeh Ajorloo[1], Mohsen Vaez[2], Jafar Hemmat[2]

[1]Ph.D. student, Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran. [2]Assistant Professor, Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: A portion of biodiversity and variability of life on earth belongs to the yeasts. The caroptenoid-producing yeasts are economically important and their distinct natural habitats are of interest. In this study, isolation and molecular identification of carotenoid-producing yeasts of the exudates of endangered birch trees (*Betula pendula* Roth.) at Marmisho in Northwest Iran were performed.

Materials & Methods: This cross-sectional study carried out by sampling from exudates of birch trees (*Betula pendula* Roth.) at a natural habitat located in West Azerbaijan Province in Northwest of Iran. Using selective media, the isolation of the yeasts was done. The screening was initially based on the color and shape of the colonies during one-month incubation along with simple rapid tests to check the existence of carotenoid pigments. Finally, the D1/D2 region rDNA sequencing was accomplished for 19 isolates.

Results: 19 out of 45 isolates with pink-red colonies were selected for ribosomal gene sequencing. Phylogenetic results showed that the carotenoid-producing yeasts are in the Basidiomycota division including *Rhodotorula*, *Cystofilobasidium*, *Cystobasidium*, *Rhodosporidiobolus*, *Ustilentyloma,* and *Xanthophyllomyces*.

Conclusion: The unique pattern of carotenogenic yeasts community at this ecological niche and placing in 6 genera with the capability to produce a variety of carotenoid structures indicate that the exudates of birch trees (*Betula pendula* Roth.) include a wide diversity for native carotenoid-producing yeasts. This study is the first report presenting the diversity of carotenoid-producing yeasts in the Northwest of Iran with a distinct consortium of native yeasts at this habitat.

Keywords: Yeast, Carotenoid pigments, Astaxanthin, Biodiversity, Birch trees of Marmisho.

Correspondence to: Mohsen Vaez

Tel: +98 2156276020

E-mail: mvaez@irost.ir

Journal of Microbial World 2019, 12(2): 139-149.

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.