

مقاله تحقیقی

معرفی تعدادی از مخمرهای رورست گیاهی از ایران

فرید بیکی

مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
مسئول مکاتبات: فرید بیکی، ایمیل: f.beiki@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳/۰۲/۱۴۰۰

۸(۱) ۱۰۱-۱۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳/۰۱/۱۴۰۰

چکیده

مخمرها، موجوداتی تک سلولی وابسته به سلسله قارچ ها هستند که در مبحث کنترل بیولوژیکی از اهمیت بالایی برخوردار می باشند و گونه های متعددی به صورت محصول بیو کنترل در سطح تجاری تولید و عرضه شده است. در ایران نیز تاکنون چندین گونه مخمر به عنوان عامل بیو کنترل جداسازی و معرفی شده است، از این رو هدف این بررسی، تعیین تنوع مخمرها از میکروفلور کشاورزی می باشد. بدین منظور مخمرهای رورست از میکروفلور طبیعی و بومی گیاهان زراعی و باغی در طی سال های ۹۵-۱۳۹۴، از مناطق نوار شمالی کشور و نیز از برخی نقاط دیگر کشور، جداسازی شدند. کلیه جدایه ها با استفاده از محیط غذایی مالت آگار جداسازی و خالص سازی شده و براساس خصوصیات ریخت شناختی پرگنه ها به گروه های مجزای مقدماتی تفکیک شدند. بر اساس خصوصیات ریخت شناختی نظیر رنگ و فرم پرگنه، ۲۴ جدایه به عنوان نماینده برای شناسایی انتخاب شدند. نتایج آزمون های بیوشیمیایی با استفاده از ضریب تشابه ساده نشان می دهد، جدایه ها در سطح ۸۷ درصد، در ۱۴ خوشه مجزا قرار می گیرند. برای شناسایی تکمیلی، ۲۴ جدایه به عنوان نماینده این ۱۴ گروه انتخاب و برای بررسی تعیین ترادف قسمتی از ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 (بر اساس آغازگرهای ITS4 و ITS1) انتخاب شدند. بر این اساس، تعلق جدایه های مورد بررسی در این تحقیق به تعداد ۱۲ گونه به شرح ذیل مورد تایید قرار گرفت: *Aureobasidium pullulans*, *Candida membranifaciens*, *Cystobasidium minutum*, *Debaryomyces hansenii*, *Filobasidium magnum*, *Metschnikowia korensi*, *Naganishia albida*, *Ogataea zsolitii*, *Papiliotrema flavescens*, *Rhodotorula glutinis*, *R. mucilaginosa*, *Sporobolomyces ruberrimus*. از بین این موارد، گونه های *O. zsolitii*, *M. korensi*, *P. flavescens*, *C. minutum*: اولین گزارش برای ایران می باشند. جدایه های حاصل با استفاده از ریخت شناختی میکرو یا ماکروسکوپی، بررسی و پرگنه ها از لحاظ رنگ، شکل، اندازه و شکل سلول و مکان جداسازی آن ها توصیف شدند.

واژه های کلیدی: مخمر، تنوع زیستی، سطح گیاه، بیو کنترل

مقدمه

خصوص توسعه کنترل بیولوژیکی پس از برداشت صورت گرفته است. استفاده از مخمرها به عنوان آنتاگونیست، به دلیل توانایی بازدارندگی بالای آن ها و توانایی استقرار در سطوح در طولانی مدت بسیار زیاد بررسی شده است (Liu et al., 2013). از شروع تحقیقات پیشین در دهه ۱۸۶۰ توسط پاستور، دنیای مخمرها به ویژه در خصوص مفاهیمی از جمله خصوصیات ریخت شناسی، تاکسونومیک، ژنتیکی و نیز

در دهه های گذشته در خصوص قابلیت آنتاگونیستی مخمرها مطالب بسیاری بیان شده است. در دهه ۱۹۸۰ افرادی هم چون جانسیویز (Janisiewicz, 1987) و چالوتز و همکاران (Chalutz et al., 1988) جنبه های مثبتی از اینکه مخمرها دارای توانایی کنترل بیماری ها می باشند، را ارائه کرده اند. در طی سال های گذشته نیز تحقیقات بسیاری در

استاندارد نظیر امکان استفاده و تخمیر منابع کربنی و ازتی، تولید ترکیبات مشابه نشاسته و سایر معیارهای رشدی استفاده کرد (Liu et al., 2015). بررسی‌های پیشین نشان می‌دهد مخمرها را می‌توان از منابع گیاهی مختلف نظیر سطوح میوه‌ها، شاخ و برگ، ریشه و حتی از خاک جدا کرد. نظیر جداسازی مخمرهای *Candida oleophila* Kaisha & Lizuka (1967) از سطوح میوه (Wilson et al., 1993)، *Rhodotorula glutinis* (Fresen) F. C. Harrison (1928) از شاخ و برگ گوجه فرنگی (Kalogiannis et al., 2006)، *Pichia guilliermondii* Wick (1966) از سطح میوه *Kloeckera apiculate* (Reess) (Droby et al., 1993)، Janke (1923) از ریشه مرکبات (Long et al., 2007)، *Cystofilobasidium infirmominiatum* (Fell, I.L. Hunter & Tallman) Hamamoto, Sugiyama & Komagata (1988) از سطح میوه لیمو (Vero et al., 2011)، *Candida saitoana* Nakase & M. Suzuki (1985) از سطح میوه نارنج (El-Ghaouth et al., 1998)، *Pichia caribbica* Vaughan-Martini, Kurtzman, S.A. Meyer & E.B. O'Neill (2005) از خاک باغ‌های میوه (Zhao et al., 2012) و غیره. در ایران نیز در سال‌های اخیر مخمرهای مختلفی از منابع گیاهی جدا شده‌اند که می‌توان به آن‌ها اشاره نمود: از شاخه آسکومایکوتا مخمرهای *Candida membranifaciens* (Lodder Kreger) Wick. *Pichia guilliermondii* & K. A. Burton (1954) (Wickerham (1966) و از شاخه بازیدیومایکوتا نیز گونه‌های *Sporobolomyces ruberrimus* Yamasaki & H. Fujii ex Fell, Pinel, Scorzetti, Statzell & Yarrow (2002); *Naganishia albida* (Saito) X. Z. Liu, F.Y. Bai, Groenewald & Boekhout (2015); *Filobasidium magnus* (Lodder & Kreger) Baptist & Kurtzman (2015); *Rhodotorula Rhodotorula* sp. (Beiki et al., 2013)، مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg) F.C. Harrison (2019) (Alavi Fard et al., 2012)، مخمر *Cryptococcus adeliensis* (Fard et al., 2012)، Scorzetti, I. Petrescu, Yarrow & Fell (2000)، (Borhani et al., 2013; Borhani & Rahimian, 2013)، مخمر *C. uzbekistanensis* Á. Fonseca, Scorzetti & Fell (2000) (Dehghan-Niri et al., 2015)، مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg) F.C. Harrison (2019) (Alavi Fard et al., 2012) و مخمر

توسعه تجاری آن‌ها پیشرفت قابل توجهی داشته است. با این اوصاف تاکنون در مقایسه با دیگر میکروارگانیسم‌هایی نظیر تولیدکننده‌های آغازین، پردازورها، بیمارگرها و عوامل مهم چرخه تغذیه اکوسیستم‌های طبیعی، برای مخمرها نقش کمتری در بیوسفر در نظر گرفته شده است و به طبع آن در خصوص بررسی تنوع زیستی آن‌ها نیز بسیار غفلت شده است (Lachance et al., 2001). مخمرها از اکوسیستم‌های طبیعی و مصنوعی مختلفی جداسازی شده‌اند و به تبع آن جنس و گونه‌های متنوعی از اکوسیستم‌های مختلف از جمله از دریاها، خاک، جنگل و غیره معرفی شده‌اند (Buzzini et al., 2017). بر اساس گزارش‌های ارائه شده تا سال ۲۰۰۵، اگر تعداد گونه‌های قارچی را بیش از ۱/۵۰۰/۰۰۰ تخمین بزنیم، تعداد گونه‌های مخمر گزارش شده حدود ۷۴/۰۰۰ عدد می‌باشد، این در حالی است که برای باکتری‌ها ۱/۰۰۰/۰۰۰ و برای گیاهان تعداد ۲۷۰/۰۰۰ عدد برآورد می‌شود (Kurtzman et al., 2011). قبل از مرسوم شدن تعیین ترادف ژنی، از خصوصیات ریخت‌شناسی برای بررسی‌های فیلوژنتیکی مخمرها استفاده می‌شده است. بر این اساس، سال‌ها مخمرها به‌عنوان قارچ‌های ابتدایی مطرح و در گروه آسکومیست‌ها در نظر می‌گرفته می‌شدند. اما امروزه می‌توان گفت مخمرها از لحاظ جایگاه تاکسونومیک، به یک گروه تاکسونومیک یا فیلوژنتیکی خاص تعلق نداشته، بلکه می‌توان آن‌ها را در دو شاخه‌ی مجزای آسکومیست و بازیدیومیست گروه‌بندی نمود (Kurtzman et al., 2011). مخمرهای بازیدیومیست، قارچ‌های تک سلولی و یا دوریختی هستند که متعلق به سه زیر شاخه *Pucciniomycotina*، *Ustilaginomycotina* و *Agaricomycotina* بوده (Wang et al., 2015) و مخمرهای متعلق به آسکومیست نیز در سه زیرشاخه *Saccharomycotina*، *Taphrinomycotina*، و *Pezizomycotina* قرار می‌گیرند (Buzzini et al., 2017). برای توصیف نیز می‌توان از خصوصیات ریخت‌شناختی نظیر: ساختار تکثیری جنسی و غیرجنسی، خصوصیات ترکیبات شیمیایی نظیر ساختار دیواره سلولی و انواع یوبی‌کینون، خصوصیات فیزیولوژیکی بر اساس آزمون‌های

خصوصیات آزمون‌های بیوشیمیایی و انجام آزمون مولکولی انتخاب شدند.

شناسایی مخمرها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی

بر اساس خصوصیات بیولوژیکی یا فیزیولوژیکی و بررسی میزان توانایی مخمرها در استفاده از ترکیبات شیمیایی به عنوان منابع کربن و ازت، از محیط پایه آیربا غلظت ۱٪ قند یا اسید آمینه مورد نظر، استفاده شد (Schaad *et al.*, 2001) (جدول ۱).

شناسایی مخمرها با استفاده از روش‌های مولکولی

برای بررسی موقعیت تاکسونومیک مخمرها از تعیین ترادف ناحیه ITS شامل قسمتی از ناحیه SSU، کل ناحیه ITS1، 5.8 S، ITS2 برای تکثیر این ناحیه از آغازگرهای 5'-(ITS1) 3'-(TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و 5'-(ITS4) 3'-(TCCTCCGCTTATTGATATGC) استفاده شد (White *et al.*, 1990). برای استخراج DNA از سلول‌های کشت شده به مدت ۴۸ ساعت روی محیط کشت مالت آگار محصول شرکت Difco با استفاده از کیت Wizard Genomic DNA Purification Kit (محصول شرکت Promega، شهر Madison، کشور آمریکا) انجام شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: یک میکرولیتر DNA نمونه، ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer 10X، ۰/۵ میکرومولار از هر یک از دو آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs و ۱/۵ واحد Taq پلی‌مرز بود. شرایط زمانی و دمایی شامل مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه مجزا (شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر به DNA ژنومی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس و تکثیر DNA در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه) بوده و یک مرحله بسط تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه نیز انجام شد (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). نمونه‌ها برای تخلیص محصول PCR و تکثیر ژن‌های مورد بررسی، از هر

Rhodospiridium spp. (Mokhtarnejad *et al.*, 2015)، را می‌توان نام برد. البته از خاک و نیز اطراف دریاچه ارومیه مخمرهایی گزارش شده است (Mokhtarnejad *et al.*, 2016; Mokhtarnejad *et al.*, 2015).

مواد و روش‌ها

به منظور جداسازی مخمرهای رورست، نمونه‌هایی از مناطق مختلف شمال کشور و نیز به تعداد محدودتری از برخی از استان‌های دیگر نظیر خراسان جنوبی، یزد، بندرعباس، آذربایجان شرقی، اصفهان، از گیاهان زراعی و باغی عمده در مزارع و باغات و از محصولاتی نظیر پنبه، توت، تاغ، گندم، کلزا، توت فرنگی، مرکبات، گوجه فرنگی، فلفل، انار، پسته، انگور، سویا، گردو، به، هلو، برنج، آفتابگردان، خیار و چای انتخاب و در مجموع ۱۵۶ نمونه برگ و سرشاخه به آزمایشگاه ارسال شد. پس از انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌ها درون ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵ درصد تووین ۲۰ (Tween 20) و بافر فسفات بافر فسفات (NaCl 0.8%, KCl 0.02%, NaH₂PO₄ 0.115%, K₂HPO₄ 0.25%) (Obanor *et al.*, 2002) بر روی شیکر به مدت ۳۰ دقیقه و با دور ۱۵۰ rpm قرار داده شدند، سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله بر روی محیط کشت مالت آگار (malt agar) شرکت Difco، حاوی سولفات استریتومایسین به میزان ۰.۱ (w/v) % (Wang *et al.*, 2009) به همراه آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (100ppm) و آمپی‌سیلین (50ppm) (Benbow & Sugar 1999) کشت و به مدت سه روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از خالص‌سازی و اطمینان از وجود مخمر با مشاهده در زیر میکروسکوپ، نمونه‌ها برای انجام سایر بررسی‌ها، در یخچال نگهداری شدند. از خصوصیات فیزیولوژی یا بیولوژی، برای شناسایی و از خصوصیات ریخت‌شناختی برای توصیف جدایه‌ها استفاده شد. کلیه جدایه‌ها براساس خصوصیت‌های ریخت‌شناسی نظیر شکل، رنگ و میزان رشد پرگنه، به ۲۴ گروه تقسیم شدند و از هر گروه نماینده‌ای برای بررسی سایر

ریخت‌شناختی پرگنه (از لحاظ رنگ، نحوه گسترش پرگنه و...) به چندین گروه مقدماتی تقسیم شدند. تنوع رنگ (نظیر رنگ های قرمز، سفید شیری، کرم، صورتی و غیره) در پرگنه‌های مخمر قابل مشاهده بود. نتایج اولیه نشان داد در استان‌های شمالی، نمونه‌ها ضمن دارا بودن تنوع بیشتر مخمر، میزان جمعیت جدایه‌ها در هر نمونه، به مراتب بالاتر از سایر نمونه‌های ارسالی از دیگر مناطق کشور بوده است، به نظر می‌رسد اقلیم بارانی در شمال کشور و یا ابری بودن بیشتر در طی سال یا دمای مناسب، بر تنوع مخمرها و کمیت آن‌ها تاثیر قابل ملاحظه‌ای داشته است. از ۳۴ گروه منفک شده بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی نظیر رنگ، شکل، برآمدگی و حاشیه کلونی، مخاطی بودن و تولید ریشه، نمایندگانی انتخاب و ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها بررسی شد (جدول ۱). برای گروه‌بندی بر اساس این خصوصیات اخیر، دندروگرام حاصل از نتایج آزمون بیوشیمیایی به روش Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means (UPGMA) و با ضریب تشابه ساده (Simple Matching Coefficient) در نرم‌افزار MVSP 3.2 ترسیم شد. نتایج نشان داد بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی مورد بررسی، در سطح تشابه ۸۷ درصد، نمایندگان کلیه جدایه‌های مورد بررسی، در ۱۲ خوشه متفاوت از یکدیگر قرار گرفتند.

نتایج بررسی‌های فیلوژنتیکی

برای بررسی ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌ها بر اساس ترادف ناحیه ژنی ITS با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4، پس از تکثیر با PCR قطعه‌ای به طول ۵۶۴bp تولید شد (شکل ۱). نتایج حاصل از تعیین ترادف، پس از بررسی و آماده‌سازی با کمک نرم‌افزارهای Sequencher ver. 5.4.6 و Bioedit ver. 7.0.0 ابتدا با کمک نرم‌افزار BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) با ترادف‌های موجود مخمرها بر پایه ۹۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی مقایسه شدند.

دو سمت (forward , reverse) و نیز تعیین ترادف به شرکت توپازژن نماینده انحصاری شرکت Microsynth از کشور سوئیس ارسال شد. برای هم‌ردیف‌سازی چندگانه (multiple alignment) ترادف‌های به‌دست آمده از جدایه‌های مورد بررسی، از نرم‌افزار Bioedit 7.0.9.0 استفاده شد. برای مقایسه تشابه و فاصله ژنتیکی ترادف‌های به‌دست آمده به همراه سایر ترادف‌های سودوموناس‌های برگرفته از GenBank، از نرم‌افزار MegaX استفاده شد. ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های مخمر بر اساس توالی ناحیه ITS. درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbour-Joining و ماتریکس فاصله Jukes-Cantor ترسیم گردید. برای Bootstrap ۱۰۰۰ تکرار در نظر گرفته شده و از outgroup استفاده شد به‌عنوان *Byssoschlamys spectabilis* (Kumar et al., 2018).

خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌های منتخب

به منظور بررسی خصوصیات ریخت‌شناختی، از کشت ۴۸ ساعته مخمرها در محیط کشت مالت آگار، نمونه‌هایی از سلول‌های مخمر بر روی لام تهیه شد. ابعاد سلول‌ها به کمک میکروسکوپ Leica DM2500 M اندازه‌گیری شد، بدین صورت که ابعاد حدود ۵۰ سلول مخمر به صورت تصادفی انتخاب و در دو جهت طولی و عرضی در مقیاس میکرومتر، اندازه‌گیری و میانگین کلی ابعاد برای هر جدایه مخمر، تعیین شد. برای توصیف ریخت‌شناختی پرگنه‌ها، ۴۰ روز پس از کشت روی محیط کشت مالت آگار، رنگ، توانایی تولید لعاب و برخی از فاکتورهای دیگر از جمله نوع شکل (form)، نوع برآمدگی (elevation) و چگونگی حاشیه پرگنه‌ها (margin) ثبت شدند (Mehrotra, 2009).

نتایج و بحث

نتایج آزمون ریخت‌شناسی

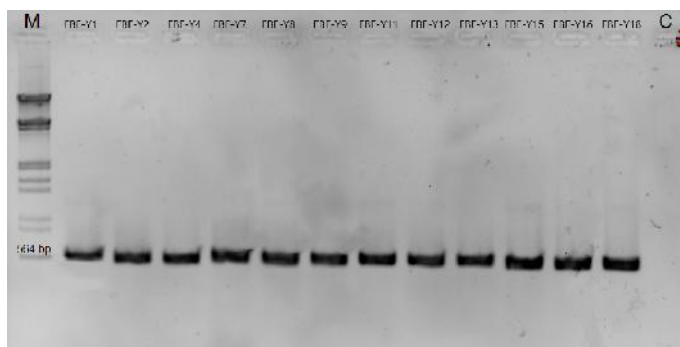
پس از کشت سوسپانسیون حاصله از شستشوی میوه‌های سالم، حدود ۷۰۰ جدایه مخمر، جداسازی و خالص‌سازی شده و جهت انجام آزمون‌های بعدی، نگهداری شدند. به دلیل فزونی تعداد مخمرهای به‌دست آمده، مخمرها بر اساس

جدول ۱- ویژگی های فیزیولوژیکی جدایه های مخمر جداسازی شده از نمونه های گیاهی

Table 1. Physiological characteristics of yeast isolates collected from plant specimens

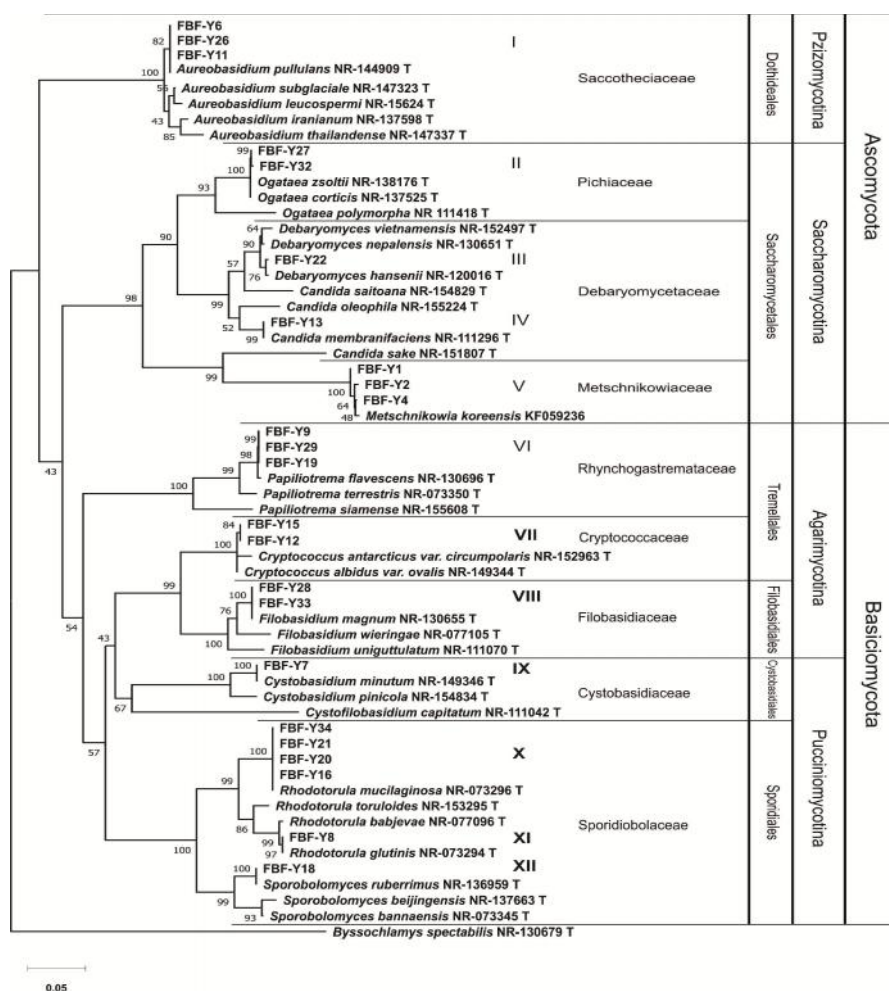
Isolates	Xylose	L-Arabinose	Arabinose	Ribose	Sorbose	Rhamnose	Glucose	Galactose	Melzitose	Sucrose	Melibiose	Lactose	Trehalose	Maltose	Cellobiose	Raffinose	Inulin	Soluble starch	Ribitol	Galactitol	Sorbitol	D-Glucosamine	Mannitol	Sorbitol	Inositol	Ethanol	Glycerol	Erythritol	myo-Inositol	Salicin	Glucosamine	DL-Lactate	Succinate	Citrate	
FBF-Y1	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
FBF-Y2	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
FBF-Y4	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
FBF-Y6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y8	-	w	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
FBF-Y9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
FBF-Y19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FBF-Y34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) Growth; (-) No growth; (W) Weakly growth; (V) Variable; (.) Not determined



شکل ۱ - قطعه تکثیر شده ITS در جدایه‌های مخمر، M نشانگر جرم مولکولی (Phage Lambda DNA/EcoRI/Hind III)، C: شاهد منفی (آب مقطر به جای DNA).

Fig 1. Agarose-gel electrophoresis of PCR products of ITS region of yeast isolates. Lane M, molecular size markers (Phage Lambda DNA/EcoRI/Hind III), Lane C: negative control (sterile water instead of DNA)



شکل ۲- ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های مخمر بر اساس توالی ناحیه ITS. درخت فیلوژنی به روش Neighbour-Joining. برای Bootstrap ۱۰۰۰ تکرار در نظر گرفته شده است. *Byssoschlamys spectabilis* به عنوان outgroup به کار برده شده و خط نشانه منعکس کننده تغییر ۰/۰۵ نوکلئوتید در هر جایگاه است.

Fig 2. Phylogenetic tree of yeast isolates based on the nucleotide sequences of the ITS region according to Neighbour-Joining (NJ) method. The number shown next to each node indicates the percentage bootstrap values were calculated for 1000 replicates. *Byssoschlamys spectabilis* was used as the outgroup. The scale bar represents the number of substitutions per site (0.05).

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های مخمر، کد ثبت توالی و موقعیت فیلوژنتیکی آنها بر اساس تعیین ترادف ناحیه ITS

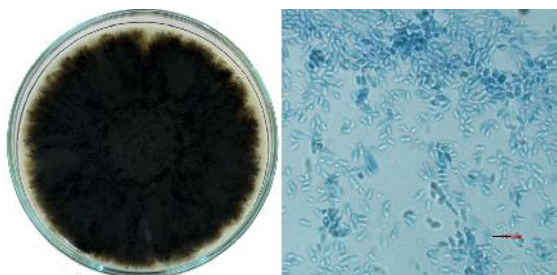
Table 2. Characteristics of yeast isolates, sequence accession number and their assignation to phylogenetic group based on the ITS region sequencing

Isolate	City	Host	NCBI code	Phylogenetic group	Closest type strain	Similarity
FBF-Y27	Fuman	Kiwifruit	MK186941	I	<i>Ogataea zsoletii</i> NR-138176 ^T	99.72
FBF-Y32	Sarayan	Cotton	MK186944	I	<i>Ogataea zsoletii</i> NR-138176 ^T	99.7
FBF-Y22	Behshahr	Citrus	MK186939	II	<i>Debaryomyces hansenii</i> NR-120016 ^T	99.8
FBF-Y13	Chalus	Kiwifruit	MK186932	III	<i>Candida membranifaciens</i> NR-111296 ^T	100
FBF-Y4	Chalus	Kiwifruit	MK186925	IV	<i>Metschnikowia koreensis</i> KF-059237 ^T	100
FBF-Y2	Tonekabon	Kiwifruit	MK186924	IV	<i>Metschnikowia koreensis</i> KF-059236 ^T	99.6
FBF-Y1	Kharvana	Mulberry	MK186923	IV	<i>Metschnikowia koreensis</i> KF-059237 ^T	99.6
FBF-Y6	Neka	Citrus	MK186926	V	<i>Aureobasidium pullulans</i> NR-144909 ^T	100
FBF-Y26	Tonekabon	Kiwifruit	MK186940	V	<i>Aureobasidium pullulans</i> NR-144909 ^T	100
FBF-Y11	Nowshahr	kiwifruit	MK186930	V	<i>Aureobasidium pullulans</i> NR-144909 ^T	100
FBF-Y9	Tonekabon	kiwifruit	MK186929	VI	<i>Papiliotrema flavescens</i> NR-130696 ^T	99.6
FBF-Y29	Behshahr	Rice	MK186943	VI	<i>Papiliotrema flavescens</i> NR-130696 ^T	99.6
FBF-Y19	Tonekabon	kiwifruit	MK186936	VI	<i>Papiliotrema flavescens</i> NR-130696 ^T	99.6
FBF-Y12	Amol	kiwifruit	MK186931	VII	<i>Cryptococcus albidus</i> NR-149343 ^T	100
FBF-Y15	Tonekabon	kiwifruit	MK186933	VII	<i>Cryptococcus albidus</i> NR-149344 ^T	100
FBF-Y33	Sarayan	Cotton	MK186945	VIII	<i>Filobasidium magnum</i> NR-130655 ^T	99
FBF-Y28	Chaboksar	Citrus	MK186942	VIII	<i>Filobasidium magnum</i> NR-130655 ^T	100
FBF-Y18	Behshahr	Rice	MK186935	IX	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i> NR-136959 ^T	100
FBF-Y8	Chalus	Kiwifruit	MK186928	X	<i>Rhodotorula glutinis</i> NR-073294 ^T	100
FBF-Y16	Gorgan	Kiwifruit	MK186934	XI	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> NR-073296 ^T	100
FBF-Y21	Kharvana	Mulberry	MK186938	XI	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> NR-073296 ^T	100
FBF-Y34	Shirgah	Kiwifruit	MK186946	XI	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> NR-073296 ^T	100
FBF-Y20	Ramsar	Kiwifruit	MK186937	XI	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> NR-073296 ^T	100
FBF-Y7	Amol	kiwifruit	MK186927	XII	<i>Cystobasidium minutum</i> NR-149346 ^T	100

استاندارد مخمرهای موجود در GenBank، با کمک نرم‌افزار MEGA ver.5، درخت‌های فیلوژنتیکی ترادف‌های

برای محاسبه تشابه و فاصله ژنتیکی ترادف‌های به‌دست آمده و مقایسه آن‌ها با ترادف‌های سایر جدایه‌های

مخمر ساپروفیت منحصر به فردی است که در فیلسفر بسیاری از گیاهان و بر روی انواع میوه‌های مناطق گرمسیری یافت می‌شود. به دلیل تولید ملانین، از آن به عنوان مخمر سیاه یاد می‌شود. وجود آن از بسیاری مناطق گزارش شده است، از آلاسکا و کانادا و آمریکا تا اروپا و از کشورهای آلمان، دانمارک، هلند و نیز از استرالیا، از برخی کشورهای مدیترانه و مناطق خشک نظیر مصر، عراق، پاکستان، افریقای جنوبی. حتی از مناطق گرمسیر نظیر برزیل، هند، مالزی و جامائیکا نیز گزارش شده است (Deshpande et al., 1992). اخیراً این گونه از جنگل خیرودکنار استان مازندران گزارش شده است (Hamidi et al., 2019).



شکل ۳- سلول و پرگنه مخمر *Areobasidium pullulans* FBF-Y26 بر روی محیط کشت مالت آگار پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. مقیاس معادل ۱۰ میکرومتر می باشد.

Fig 3. Cell and colony of *Areobasidium pullulans* FBF-Y26 on malt agar medium after 40 days at 25 ° C. Bar size is equal to 10 μm.

II-Ogataea corticis Nagats., S. Saito & Sugiy., Journal of General and Applied Microbiology Tokyo 54(6): 363 (2008)

پرگنه‌ها سفید مایل به شکلاتی کدر (opaque)، دایره‌ای (circular)، همراه با کمی برآمدگی (raised) و با حاشیه کنگره‌ای (lobate) می‌باشند. میانگین سلول‌های اندازه‌گیری شده نشان می‌دهد، سلول‌ها با ابعاد متوسط ۲/۸۹ × ۱/۹۲ میکرومتر، تقریباً کروی تا بیضی شکل هستند (شکل ۴). جدایه‌های FBF-Y27 و FBF-Y32 متعلق به این گونه بوده که در تیره Pichiaceae قرار می‌گیرند. این گونه توسط یامادا و همکاران در سال ۱۹۹۴ ارایه شده است (Yamada et

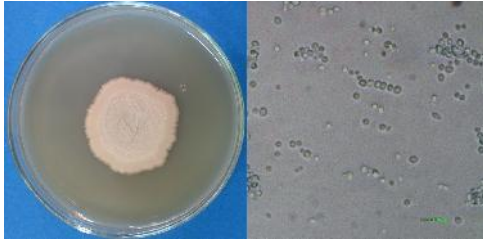
حاصله بر اساس ۳۹۴ نوکلئوتید ترسیم شد. نتایج نشان می‌دهد جنس‌های *Rhodotorula* sp.، *Sporobolomyces*، *Filobasidium* sp.، *Cystobasidium* sp.، *Metschnikowia*، *Papiliotrema* sp.، *Naganishia* sp.، *Ogataea* sp.، *Debaryomyces* sp.، *Candida* sp.، *Aureobasidium* sp. قابل ارایه می‌باشند. پنج گروه اول مربوط به چهار تیره از شاخه آسکومیست بوده و هفت گروه بعدی متعلق به ۵ تیره مختلف از شاخه بازیودیومیست می‌باشند (شکل ۲ و جدول ۲).

خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌های منتخب

توصیف جدایه‌ها با استفاده از سلول‌ها و پرگنه‌های ۴۰ روزه رشد یافته بر روی محیط کشت مالت آگار انجام شد. در این بررسی کلیه جدایه‌های مخمر را می‌توان بر اساس تعیین ترادف انجام شده در ۱۲ گروه فیلوژنتیکی (I-XII) مجزا گروه‌بندی کرد، پنج گروه فیلوژنتیکی اول وابسته به آسکومیست و باقی متعلق به بازیودیومیست‌ها بوده و همگی در دو زیر شاخه *Agarimycotina* و *Pucciniomycotina* در مجموع در هفت گروه فیلوژنتیکی VI الی XII قرار می‌گیرند.

I-Aureobasidium pullulans (De Bary) G. Arnaud ex Cif., Ribaldi & Corte, Atti dell'Istituto Botanico della Università e Laboratorio Crittogamico di Pavia 14: 85 (1957)

پرگنه‌های این مخمر در ابتدا به صورت دایره‌ای و برآمده و حاشیه کاملاً صاف، غیر لعاب‌دار و شیری رنگ و مات می‌باشد. با مسن شدن پرگنه، ریسه و ضمایمی در اطراف پرگنه تولید می‌شود و به واسطه تولید کلامیدوسپور، رنگ پرگنه تیره‌رنگ می‌شوند. این جدایه‌ها دارای رشد بسیار سریعی در مقایسه با سایر جدایه‌های مورد بررسی می‌باشد. برآمدگی پرگنه در حالت ریسه‌دار مشاهده نمی‌شود و می‌توان گفت حاشیه یا کناره پرگنه به صورت رشته‌ای در می‌آید (شکل ۳). ابعاد سلول‌ها به طور متوسط حدود ۶/۰۸ × ۲/۸۷ میکرومتر بوده و می‌توان گفت تقریباً میله‌ای شکل هستند (شکل ۳). سه جدایه FBF-Y6، FBF-



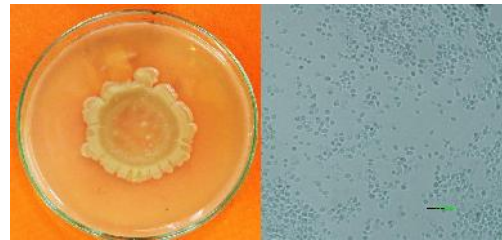
شکل ۵- سلول و پرگنه‌ی مخمر *Debaryomyces hansenii* FBF-Y22 بر روی محیط کشت مالت آگار پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. مقیاس معادل ۱۰ میکرومتر می‌باشد.

Fig 5. Cell and colony of *Debaryomyces hansenii* FBF-Y22 on malt agar medium after 40 days at 25 ° C. Bar size is equal to 10 µm.

IV-*Candida membranifaciens* (Lodder & Kreger) Wick. & K.A. Burton, Journal of Bacteriology 68 (5): 597 (1954)

از این گونه جدایه FBF-Y13 قابل ارایه می‌باشد. پرگنه‌ها به رنگ سفید تا شکلاتی، مات، به فرم دایره‌ای و به دو فرم برآمدگی صاف و برجستگی در مرکز (umbonate) می‌باشد. حاشیه پرگنه می‌تواند به صورت صاف تا رشته‌ای (filamentous) تشکیل شود. در ادامه رشد ریشه‌های کاذب متشکل از انشعاب زنجیره‌های بیضی شکل تشکیل می‌شود. پرگنه‌ها در محیط مالت آگار حاوی درصد سوکروز، لعابی تولید نمی‌کنند. سلول‌ها اغلب به صورت انفرادی و ابعاد آن به طور متوسط 4.4×3.92 میکرومتر می‌باشد (شکل ۶). در ایران این گونه پیشتر گزارش شده و از آن برای کنترل کپک آبی سیب توسط این گونه مخمر گزارش شده است (Farahani *et al.*, 2011; Gholamnejad *et al.*, 2010). بین کلیه مخمرهای شاخه آسکومیست مورد بررسی در این تحقیق، تنها این گونه بوده که توانایی استفاده از گالاکتیتول را داشته است.

Pichia zsoitii G. Péter, آن اسم قبلی *al.*, 1994) می‌باشد (Tornai-Leh., Fülöp & Dlačny, (2003) (Péter *et al.*, 2003). از بین جدایه‌های مورد بررسی، جدایه‌های این گونه توانایی استفاده از متانول را دارا می‌باشد. تاکنون از ایران گزارشی از این گونه مخمر ارایه نشده است.



شکل ۴- سلول و پرگنه مخمر *Ogataea zsoitii* FBF-Y27 بر روی محیط کشت مالت آگار پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. مقیاس معادل ۱۰ میکرومتر می‌باشد.

Fig 4. Cell and colony of *Areobasidium pullulans* FBF-Y27 on malt agar medium after 40 days at 25 ° C. Bar size is equal to 10 µm.

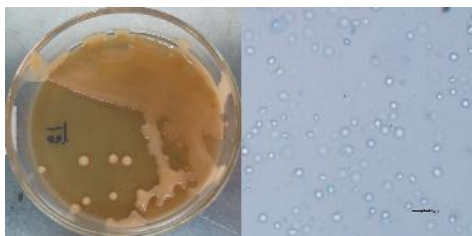
III-*Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger, The Yeasts: a taxonomic study: 280 (1952)

تنها مخمر متعلق به این گونه جدایه ۲۲ می‌باشد. پرگنه با سطح صاف (flat) تا کمی برآمده (raised) و کدر (opaque) می‌باشد. رنگ آن، کرم مایل به صورتی بوده که به شکل دایره‌ای با حاشیه مضرس (erose) می‌باشد. سلول‌ها کروی تا کمی بیضی شکل و متوسط ابعاد آنها، $3/4 \times 2/67$ میکرومتر می‌باشند (شکل ۵). از این مخمر در صنایع غذایی و بهداشتی (Sarvtin *et al.*, 2014) استفاده می‌شود. در کنترل بیولوژیک پس از برداشت نیز گزارش شده است که به خوبی قادر به کنترل کپک‌های سبز و آبی میوه مرکبات می‌باشد (Chalutz & Wilson 1990; Droby *et al.*, 1989; Droby *et al.*, 1999; Mehrotra *et al.*, 1998; Mehrotra *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2009)

ایران گزارش شده است (Mokhtarnejad *et al.*, 2016)

VI-*Papiliotrema terrestris* Crestani, Landell, Faganello, Vainstein, Vishniac & P. Valente ex Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout, *Studies in Mycology* 81: 127 (2015)

پرگنه دایره‌ای شکل، با برآمدگی محدب تا گنبدی، با حاشیه کاملاً صاف، به رنگ کرم مایل به زرد با که با افزایش رشد، لعاب زیادی نیز تولید می‌شود. سلول‌ها دارای ابعادی بین $3/6 \times 2/26$ میکرومتر می‌باشند (شکل ۳۶). از این گونه سه جدایه FBF-Y9, FBF-Y19, FBF-Y29 وجود دارد (شکل ۸). این گونه از انگور در داغستان جدا شده است (Kachalkin *et al.*, 2015) و تاکنون گزارشی از این گونه در ایران نداشته‌ایم.

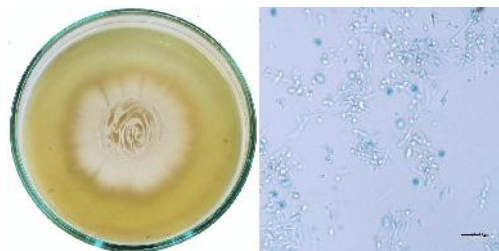


شکل ۸- سلول و پرگنه‌های مخمر *Papiliotrema terrestris* FBF-Y19 بر روی محیط کشت مالت آگار پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. مقیاس معادل ۱۰ میکرومتر می‌باشد.

Fig 8. Cell and colonies of *Papiliotrema terrestris* FBF-Y19 on malt agar medium after 40 days at 25 ° C. Bar size is equal to 10 μm.

VII-*Naganishia albida* (Saito) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout, *Studies in Mycology* 81: 118 2015.

پرگنه‌ها در ابتدا به شکل مدور، بدون برآمدگی با ناف برآمده بوده که حاشیه کاملاً صاف به خود می‌گیرد. رنگ پرگنه‌ها به صورت کرم مات می‌باشد. به تدریج پس از رشد به شکل مایل به صورتی و نرم همراه با کمی سطح براق در می‌آید. پرگنه دایره‌ای به کمی برآمدگی و با حاشیه دارای انحناء می‌باشد. سلول‌ها بیضی شکل یا به صورت گسترده بیضی با ابعاد $4/17 \times 3/06$ میکرومتر می‌باشند (شکل ۹). دو جدایه FBF-Y12, FBF-Y15 مربوط به این گونه می‌باشند. اسم پیشین آن نیز *Cryptococcus albidus* (Liu *et al.*, (Saito) C.E. Skinner (1950) آن می‌باشد)

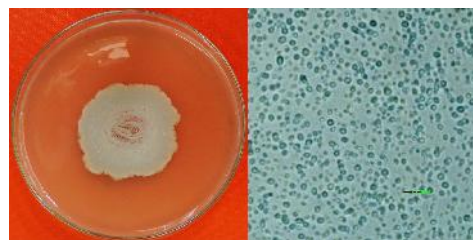


شکل ۶- سلول و پرگنه‌ی مخمر *Candida membranifaciens* FBF-Y13 بر روی محیط کشت مالت آگار پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. مقیاس معادل ۱۰ میکرومتر می‌باشد.

Fig 6. Cell and colony of *Candida membranifaciens* FBF-Y13 on malt agar medium after 40 days at 25 ° C. Bar size is equal to 10 μm.

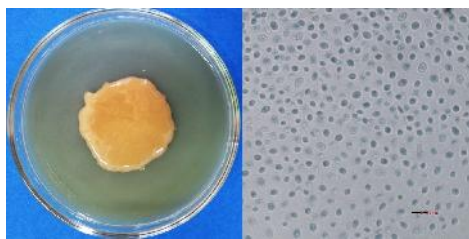
V-*Metschnikowia koreensis* S.G. Hong, J. Chun, H.W. Oh & Bae, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51 (5): 1928 (2001)

پرگنه‌ها در ابتدا سفید تا کرمی و براق و کره‌ای با حاشیه مدور و دارای برآمدگی جزئی بوده، اما با گذشت زمان رنگ آنها شکلاتی تا قهوه‌ای، غیر لعابدار و مات شده و سطح پرگنه صاف تا کمی برآمده و با حاشیه کنگره‌ای می‌باشد. سلول‌ها، گرد تا بیضی به ابعاد $3/6$ ، $2/46$ میکرومتر می‌باشند (شکل ۷)، جدایه‌های FBF-Y1, FBF-Y2, FBF-Y4 به این گونه تعلق دارند. این گونه اولین بار در سال ۲۰۰۱ از گل و میوه در کره جداسازی شد (Hong *et al.*, 2001) در ایران گزارشی از وجود آن تا کنون ارایه نشده است. این سه گونه ارایه شده همگی مربوطه به راسته Saccharomycetales از شاخه آسکومیست می‌باشند.



شکل ۷- سلول و پرگنه‌ی مخمر *Metschnikowia koreensis* FBF-Y4 بر روی محیط کشت مالت آگار پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. مقیاس معادل ۱۰ میکرومتر می‌باشد.

Fig 7. Cell and colony of *Metschnikowia koreensis* FBF-Y4 on malt agar medium after 40 days at 25 ° C. Bar size is equal to 10 μm.



شکل ۱۰- سلول و پرگنه مخمر *Filobasidium magnum* FBF-Y28 بر روی محیط کشت مالت آگار پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. مقیاس معادل ۱۰ میکرومتر می باشد.

Fig 10. Cell and colony of *Filobasidium magnum* FBF-Y28 on malt agar medium after 40 days at 25 ° C. Bar size is equal to 10 μm.

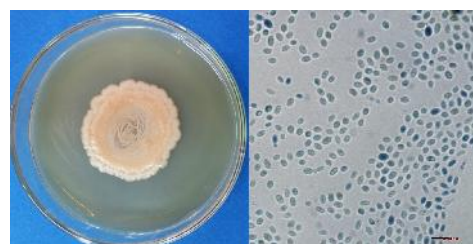
IX- *Cystobasidium minutum* (Saito) Yurkov, Kachalkin, H.M. Daniel, M. Groenew., Libkind, V. de Garcia, Zalar, Gouliam., Boekhout & Begerow, Antonie van Leeuwenhoek 107 (1): 180 (2014)

پرگنه‌ها دایره‌ای شکل، برآمده تا محدب، دارای انحناء در حاشیه و مات می‌باشند. به رنگ نارنجی مایل به آجری و فاقد ریشه کاذب می‌باشند. سلول‌ها منفرد و بعضاً به صورت جفت قابل مشاهده هستند. اندازه سلول‌ها به ابعاد $2/59 \times 3/66$ میکرومتر و به صورت کروی تا بیضی شکل هستند (شکل ۱۱). این گروه شامل یک جدایه به نام FBF-Y7 می‌باشد. نام قدیمی آن *Rhodotorula minuta* (Cif. & Redaelli) F.C. Harrison (1928) (Kurtzman *et al.*, 2011) این مخمر تاکنون از آب دریاچه‌ها، اعماق لایه‌های آذرین، آب‌های تازه و از جنگل‌ها یافت شده است (Buzzini *et al.*, 2017). گونه *R. minuta* از خاک ایران نیز گزارش شده است (Mokhtarnejad *et al.*, 2015).

X- *Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg.) F.C. Harrison, Transactions of the Royal Society of Canada. Section 5, Biological Sciences 22: 191 (1928)

پرگنه به رنگ نارنجی مایل به آجری می‌باشد که البته با افزایش رشد، میزان رنگ در آن‌ها غلیظتر می‌شود. پرگنه‌ها دایره‌ای شکل، برآمده تا محدب، دارای انحناء در حاشیه و داری لعاب کمی می‌باشند. سلول‌های این گونه دارای ابعادی حدود $2/38 \times 3/64$ میکرومتر بوده و به صورت کروی تا بیضی شکل هستند. سلول‌ها منفرد و بعضاً به صورت

عملکردهای متفاوتی از این گونه در ایران گزارش شده است، از بیمارگر انسانی (Aghaei Gharehbolagh *et al.*, 2017)، تا موثر در القاء مقاومت در گیاه مرکبات در برابر بیماری بلاست مرکبات (Beiki *et al.*, 2013)، در عین حال از توانایی آنتاگونیستی آن علیه کپک آبی سیب و کپک خاکستری توت‌فرنگی (Hashem *et al.*, 2014) نیز گزارش شده است. هم‌چنین در ایران از خاک نیز گزارش شده است (Mokhtarnejad *et al.*, 2015).



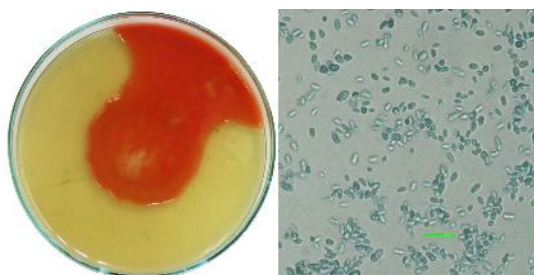
شکل ۹- سلول و پرگنه مخمر *Naganishia albida* FBF-Y12 بر روی محیط کشت مالت آگار پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. مقیاس معادل ۱۰ میکرومتر می باشد.

Fig 9. Cell and colony of *Naganishia albida* FBF-Y12 on malt agar medium after 40 days at 25 ° C. Bar size is equal to 10 μm.

VIII- *Filobasidium magnum* (Lodder & Kreger-van Rij) Xin Zhan Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout, Studies in Mycology 81: 118 (2015)

پرگنه‌ها، به فرم دایره‌ای و با برآمدگی محدب تا گنبدی و با حاشیه صاف، می‌باشد. از دیگر خصوصیات آن می‌توان به مخاطی بودن آن اشاره نمود که لعاب فراوانی تولید می‌کنند. متوسط اندازه ابعاد سلول‌ها $3/13 \times 4/46$ میکرومتر می‌باشد (شکل ۱۰). از این گونه دو جدایه FBF-Y28 و FBF-Y3 ارایه شده است. بیشتر در ایران از سطوح شاخ و برگ مرکبات نیز گزارش شده است (Beiki *et al.*, 2013). نام پیشین این مخمر نیز *Cryptococcus magnus* (Lodder & Kreger) Baptist & Kurtzman, Mycologia (1977) 68 (6): 1200 می‌باشد (Liu *et al.*, 2015).

کاذب می‌باشد. سلول‌ها بیضی‌شکل و به ابعاد $۳/۱۹ \times ۶/۸$ میکرومتر است (شکل ۱۲). از این گونه تنها یک جدایه به نام FBF-Y8 وجود دارد. پیشتر این گونه از ایران گزارش شده است (Mokhtari *et al.*, 2011). این گونه دارای پراکنش جهانی بوده و می‌توان آن را از انواع محیط‌های مختلف به دست آورد (Gadanh & Sampaio 2002). بررسی‌های متعدد نشان می‌دهد، این گونه از جنبه ریخت‌شناسی و ژنتیکی دارای تنوع قابل توجهی می‌باشد (Sampaio & Fonseca 1995). به طوری که ممکن است این گونه خود مشتمل بر چندین گونه باشد (Gadanh & Sampaio 2002).

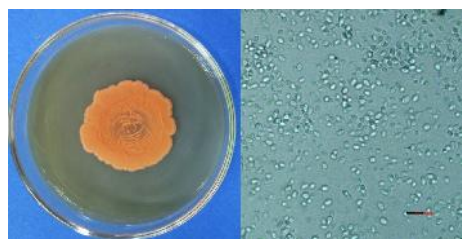


شکل ۱۳- سلول و پرگنه مخمر *Rhodotorula glutinis* FBF-Y8 بر روی محیط کشت مالت آگار پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. مقیاس معادل ۱۰ میکرومتر می‌باشد.

Fig 13. Cell and colony of *Rhodotorula glutinis* FBF-Y8 on malt agar medium after 40 days at 25 ° C. Bar size is equal to 10 μm.

XII- *Sporobolomyces ruberrimus* Yamasaki & H. Fujii ex Fell, Pinel, Scorzetti, Statzell & Yarrow, FEMS Yeast Research 1 (4): 267, (2002)
پرگنه به شکل دایره‌ای، با برآمدگی جزئی تا کمی محدب، با حاشیه دارای انحناء، رنگ پرگنه قرمز تا آجری رنگ و کره‌ای براق یا درخشان می‌باشد. سطح پرگنه صاف تا کمی مشبک می‌باشد. پرگنه‌ها کره‌ای شکل متمایل به مخاطی هستند. سلول‌ها بیضی تا کشیده بوده و به صورت انفرادی هستند ابعاد آن‌ها نیز به طور متوسط $۱/۰۳ \times ۱/۹۹$ میکرومتر می‌باشد (شکل ۱۴). جدایه FBF-Y18 از این گونه می‌باشد. اسامی مترادف آن *S. ruberrimus* var. *albus* Yamasaki & H. Fujii (1341) (Fell *et al.*

جفت قابل مشاهده هستند (شکل ۱۲). در این بررسی جدایه‌های FBF-Y16, FBF-Y20, FBF-Y21, FBF-Y34 مربوط به این گونه می‌باشند. پیشتر در ایران، این گونه از سطوح ارقام مختلف درختان سیب و مرکبات (Mokhtari *et al.*, 2011) و نیز از خاک گزارش شده است (Mokhtarnejad *et al.*, 2015).



شکل ۱۱- سلول و پرگنه مخمر *Cystobasidium minutum* FBF-Y7 بر روی محیط کشت مالت آگار پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. مقیاس معادل ۱۰ میکرومتر می‌باشد.

Fig 11. Cell and colony of *Cystobasidium minutum* FBF-Y7 on malt agar medium after 40 days at 25 ° C. Bar size is equal to 10 μm.



شکل ۱۲- سلول و پرگنه مخمر *Cystobasidium minutum* FBF-Y34 بر روی محیط کشت مالت آگار پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. مقیاس معادل ۱۰ میکرومتر می‌باشد.

Fig 12. Cell and colony of *Cystobasidium minutum* FBF-Y34 on malt agar medium after 40 days at 25 ° C. Bar size is equal to 10 μm.

XI- *Rhodotorula glutinis* (Fresen.) F.C. Harrison, Transactions of the Royal Society of Canada. Section 5, Biological Sciences 22: 190 (1928)
پرگنه دایره‌ای، کمی محدب و با حاشیه صاف می‌باشد. رنگ پرگنه قرمز مایل به پرتقالی می‌باشد. سطح پرگنه صاف، جلادار، براق، لعاب‌دار، مخاطی و فاقد ریشه

پلی‌ساکاریدی می‌باشند. البته جدایه‌های گروه VIII که متعلق به تیره Filobasidiaceae، قادر به استفاده از نشاسته می‌باشند. در مورد مخمرهای آسکومیست‌ها نیز جدایه‌های گونه‌های *Candida membranifaciens*، *Aureobasidium pullulans* در به استفاده از پلی‌ساکاریدهای اینولین و نشاسته می‌باشند. در خصوص الکل نیز اکثر جدایه‌ها توانایی استفاده از الکل‌ها را داشتند. اما کمتر گروهی قادر به استفاده از اینوزیتول می‌باشند، از این گروه‌ها می‌توان به گروه VII، VIII و V را نام برد. در بین کلیه گروه‌ها از نظر استفاده از منابع کربنی، گروه‌های V و III هر دو از شاخه آسکومیست‌ها، به ترتیب با ۹۴/۶ و ۸۳/۸ درصد بیشترین توانایی را در مصرف ترکیبات به‌عنوان منابع کربنی داشته‌اند، این درحالی است که گروه‌های IX و I کمترین توانایی را در استفاده از ترکیبات مورد بررسی دارا می‌باشند، به‌طوری‌که قادر نبودند تا به ترتیب ۶۱/۵ و ۵۲/۸ درصد از ترکیبات را استفاده کنند. در مجموع تعدادی از این مخمرها، نظیر گونه‌های: *O. zsoitii*، *M. koreensi*، *P. flavescens*، *C. minutum* اولین گزارش برای ایران می‌باشند.

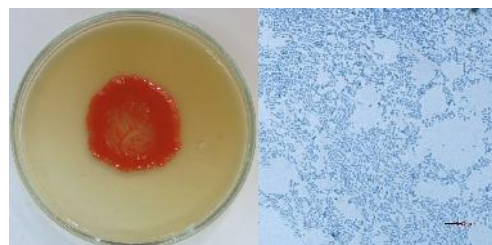
سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری‌های ارزشمند آقای دکتر پژمان خدایگان و خانم مهندس الهه واثقی از دانشگاه حضرت ولی عصر رفسنجان و نیز از آقای دکتر آنتونی بوسکت از دانشگاه UIB اسپانیا در انجام این تحقیق، سپاسگزاری می‌شود.

References

- Aghaei Gharehbolagh, S., Nasimi, M., Afshari, A., Ghasemi, Z. & Rezaie, S. 2017. First case of superficial infection due to *Naganishia albida* (formerly *Cryptococcus albidus*) in Iran: A review of the literature. *Current Medical Mycology*, 3: 33–37.
- Alavi Fard, F., Etebarian, H. & Sahebani, N. 2012. Biological control of gray mold of apple by *Candida membranifaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Pichia guilliermondii*. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 48: 17–26.
- Beiki, F., Mohamadi Gholtafeh, E., Rahimian, H., Shamsbakhsh, M., Barzegar, A., Busquets Bisbal, A. & Lalucat, J. 2013. Biological control of citrus blast disease using some yeast strains isolated from citrus orchards in the northern provinces of Iran. *Biocontrol in Plant Protection*, 1: 53–65.
- Benbow, J.M. & Sugar, D. 1999. Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Disease*, 83: 839–844.

(al., 2002). در ایران بر روی پیگمان‌های کارتوئیدی این گونه بررسی‌هایی انجام شده است (Razani et al., 2007; Razavi & Marc 2006). این گونه از سطوح مرکبات در ایران جدا شده بود (Beiki et al., 2013).



شکل ۱۴- سلول و پرگنه مخمر *Sporobolomyces ruberrimus* FBF-Y18 بر روی محیط کشت مالت آگار پس از ۴۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. مقیاس معادل ۱۰ میکرومتر می‌باشد.

Fig 14. Cell and colony of *Sporobolomyces ruberrimus* FBF-Y18 on malt agar medium after 40 days at 25 ° C. Bar size is equal to 10 μm.

در مجموع در این بررسی، در آسکومیست‌ها و از زیر شاخه Taphrinomycotina و در بازیدیومیست‌ها از زیر شاخه Ustilaginomycotina مخمری ارایه نشده است. تقریباً همه گروه‌ها توانایی استفاده انوعی از مونو و دی ساکاریدها را دارند، اما در حالی که مخمر جدایه ۱۸ از تیره Sporidiobolaceae چندان توانایی استفاده از مونوساکاریدها را ندارد، در حالی که دیگر اعضای این تیره به راحتی قادرند تا از اکثر آن‌ها به‌عنوان منابع کربنی استفاده نمایند. جدایه‌های مرتبط با بازیدیومیست‌های این بررسی، عمدتاً فاقد توانایی استفاده از کربوهیدرات‌های

- Borhani, B., Rahimian, H., Babaeizad, V. & Zohour, E. 2013. *Cryptococcus adeliensis* a yeast species inciting stem canker on stone fruit trees. *Journal of Plant Pathology*, 95: 21137–21143.
- Borhani, B. & Rahimian, H. 2013. Yeast species as the causal agents or associated with stem canker of stone fruit trees. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 49: 461–462.
- Buzzini, P., Lachance, M. & Yurkov, A.M. 2017. *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*. Springer, 499 pp, Switzerland.
- Chalutz, E., Ben-Arie, R., Droby, S., Cohen, L., Weiss, B. & Wilson, C.L. 1988. Yeasts as biocontrol agents of postharvest diseases of fruit. *Phytoparasitica*, 16: 69–75.
- Chalutz, E. & Wilson, C. 1990. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Disease*, 74: 134–137.
- Dehghan-Niri, M., Rahimian, H. & Babaeizad, V. 2015. *Cryptococcus uzbekistanensis* causing canker on stone fruit trees. *New Disease Reports*, 31: 13.
- Deshpande, M.S., Rale, V.B. & Lynch, J.M. 1992. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. *Enzyme and Microbial Technology*, 14: 514–527.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L & Wisniewski, M. 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal Of Microbiology*, 35: 794–800.
- Droby, S., Lischinski, S., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Chand-Goyal, T., Eckert, J.W. & Manulis, S. 1999. Characterization of an epiphytic yeast population of grapefruit capable of suppression of green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. *Biological Control*, 16: 27–34.
- Droby, S., Hofstein, R., Wilson, C.L., Wisniewski, M., Fridlender, B., Cohen, L., Weiss, B., Daus, A., Timar, D. & Chalutz, E. 1993. Pilot testing of *Pichia guilliermondii*, a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit. *Biological Control*, 3: 47–52.
- El-Ghaouth, A., Wilson, C.L. & Wisniewski, M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology*, 88: 282–91.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. & Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 329–337.
- Farahani, L., Etebarian, H.R., Sahebani, N. & Aminian, H. 2011. Biocontrol of blue mold of apple by *Candida membranifaciens* in combination with silicon. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45: 310–317.
- Fell, J.W., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A., Pinel, N. & Yarrow, D. 2002. Recognition of the basidiomycetous yeast *Sporobolomyces ruberrimus* sp. nov. as a distinct species based on molecular and morphological analyses. *FEMS Yeast Research*, 1: 265–70.
- Gadanho, M. & Sampaio, J.P. 2002. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis* sensu stricto and *Rh. dairenensis* comb. nov. *FEMS Yeast Research*, 2: 47–58.
- Gholamnejad, J., Etebarian, H. & Sahebani, N. 2010. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *African Journal of Food Science*, 4: 1–7.
- Hamidi, M., Kennedy, J.F., Khodaiyan, F., Mousavi, Z. & Hosseini, S. 2019. Production optimization, characterization and gene expression of pullulan from a new strain of *Aureobasidium pullulans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138: 725–735.
- Hashem, M., Alamri, Saad A., Hesham, A., Al-Qahtani, F. & Kilany, M. 2014. Biocontrol of apple blue mould by new yeast strains: *Cryptococcus albidus* KKUY0017 and *Wickerhamomyces anomalus* KKUY0051 and their mode of action. *Biocontrol Science and Technology*, 24: 1137–1152.
- Helbig, J. 2002. Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry. *Biocontrol*, 47: 85–99.
- Hong, S.G., Chun, J., Oh, H.W. & Bae, K.S. 2001. *Metschnikowia koreensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from flowers in Korea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51: 1927–1931.
- Janisiewicz, W. J. 1987. Postharvest biological control of blue mold on apple *Phytopathology*. 77: 481–485.
- Kachalkin, A.V., Abdullabekova, D.A., Magomedova, E.S., Magomedov, G.G. & Chernov, I.Y.u. 2015. Yeasts of the vineyards in dagestan and other regions. *Microbiology*, 84: 425–432.
- Kalogiannis, S., Tjamos, S.E., Stergiou, A., Antoniou, P.P., Ziogas, B.N. & Tjamos, E.C. 2006. Selection and evaluation of phyllosphere yeasts as biocontrol agents against grey mould of tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 69–76.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, 35: 1547–1549.
- Kurtzman, C., Fell, J.W. & Boekhout, T. 2011. *The Yeasts: a Taxonomic Study*. Elsevier, 178 pp, America.
- Lachance, M., Starmer, W.T., Rosa, C.A., Bowles, J.M., Barker, J.S. & Janzen, D.H. 2001. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Research*, 1: 1–8.

- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S. & Liu, Y. 2013. Review: utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 153–160.
- Liu, X.Z., Wang, Q.M., Göker, M., Groenewald, M., Kachalkin, A.V., Lumbsch, H.T., Millanes, A.M., Wedin, M., Yurkov, A.M., Boekhout, T. & Bai, F.Y. 2015. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Studies in Mycology*, 81: 85–147.
- Long, C., Deng, B. & Deng, X. 2007. Commercial testing of *Kloeckera apiculata*, isolate 34–9, for biological control of postharvest diseases of citrus fruit. *Annals of Microbiology*, 57: 203–207.
- Mehrotra, N., Sharma, N., Nigam, M. & Ghosh, R. 1998. Biological control of sour-rot of citrus fruits by yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B (Biological Sciences)*, 68:133–139.
- Mehrotra, N.K., Neeta, S., Ratna, G. & Madhulika, N. 1996. Biological control of green and blue mould disease of citrus fruit by yeast. *Indian Phytopathology*, 49: 350–354.
- Mehrotra, R.S. 2009. *Principles of microbiology*. Tata McGraw–Hill Education. New dehlm India.
- Mokhtari, M., Etebarian, H.R., Mirhendi, S.H. & Razavi, M. 2011. Identification and phylogeny of some species of the genera *Sporidiobolus* and *Rhodotorula* using analysis of the 5.8 s rDNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Archives of Biological Sciences*, 63: 79–88.
- Mokhtarnejad, L., Arzanlou, M. & Babai–Ahari, A. 2016. Molecular and phenotypic characterization of ascomycetous yeasts in hypersaline soils of Urmia Lake basin (NW Iran). *Rostaniha*. 16: 174–185.
- Mokhtarnejad, L., Arzanlou, M., Babai–Ahari, A. & Turchetti, B. 2015. Molecular identification of basidiomycetous yeasts from soils in Iran. *Rostaniha*, 16: 61–80.
- Obanor, F., Walter, M., Waipara, N. & Cernusko, R. 2002. Rapid method for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in plant tissues. *New Zealand Plant Protection*, 55: 150–153.
- Péter, G., Tornai–Lehoczki, J., Fülöp, L. & Dlačny, D. 2003. Six new methanol assimilating yeast species from wood material. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84: 147–159.
- Razani, S.H., Mousavi, S.M., Yeganeh, H.M. & Marc, I. 2007. Fatty acid and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* when using technical glycerol and ammonium sulfate. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 1591–1597.
- Razavi, S. & Marc, I. 2006. Effect of temperature and pH on the growth kinetics and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* H110 using technical glycerol as carbon source. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 25: 59–64.
- Sampaio, J.P. & Fonseca, A. 1995. Physiological aspects in the systematics of heterobasidiomycetous yeasts. *Studies in Mycology*, 38: 29–46.
- Sarvtin, M.T., Hedayati, M.T.i, Abastabar, M. & Shokohi, T. 2014. *Debaryomyces hansenii* colonization and its protein profile in psoriasis. *Iranian Journal of Dermatology*, 17: 134–137.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. APS Press, 373 pp, Minnesota.
- Sharma, R.R., Dinesh, S. & Rajbir, S. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biological Control*, 50: 205–221.
- Vero, S., Garmendia, G., Garat, M.F., de Aurecochea, I. & Wisniewski, M. 2011. *Cystofilobasidium infirmominiatum* as a biocontrol agent of postharvest diseases on apples and citrus. *Acta Horticulturae*, 905: 169–180.
- Wang, Q.M., Groenewald, M., Takashima, M., Theelen, B., Han, P.J., Liu, X.Z., Boekhout, T. & Bai, F.Y. 2015. Phylogeny of yeasts and related filamentous fungi within Pucciniomycotina determined from multigene sequence analyses. *Studies in Mycology*, 81: 27–53.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. Pp. 315–322, *In: PCR Protocols a Guide to Methods and Applications*. (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. eds.), Academic Press, San Diego.
- Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., Droby, S. & Chalutz, E. 1993. A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*, 53: 183–189.
- Yamada, Y., Maeda, K. & Mikata, K. 1994. The phylogenetic relationships of the hat-shaped ascospore-forming, nitrate-assimilating *Pichia* species, formerly classified in the genus *Hansenula* Sydow et Sydow, based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (Saccharomycetaceae): the proposals of three new genera, *Ogataea*, *Kuraishia*, and *Nakazawaea*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58: 1245–1257.
- Zhao, L., Zhang, H., Li, J., Cui, J.J., Zhang, X. & Ren, X. 2012. Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia carribbica* to postharvest diseases of strawberries by addition of trehalose to the growth medium. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 3916–3932.

Introducing some plant epiphytic yeasts from Iran**Farid Beiki**

Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Corresponding author: Farid beiki, email: f.beiki@gmail.com

Received: Apr., 20, 2021

8(1) 100–116

Accepted: May, 03, 2021

Abstract

Yeasts are single-celled microorganisms classified as members of the fungi kingdom. This group are very important in biological control, so that several species have been produced and supplied as biocontrol products at the commercial level. In Iran, several types of yeast have been isolated and introduced as biocontrol agent. Therefore, the purpose of this study is to know the yeast biodiversity from agricultural microflora. For this reason, epiphytic yeasts on crop plants and fruit trees were collected from the Northern provinces and some other parts of Iran during 2015–2016. The yeast isolates were recovered on malt agar (MA) medium. All yeast isolates were basically grouped according to the morphological characteristics of colonies. Based on morphological characteristics such as color and colony form, 24 isolates were selected as representatives for identification. The results of biochemical tests using Simple Matching Coefficient in 87% showed that all isolates are grouped into 14 separate clusters. Twenty-four isolates representatives of 14 groups were selected and analyzed by partial sequencing of ITS1–5.8S–ITS2 region with ITS1 and ITS4 primers. All isolates were identified as *Aureobasidium pullulans*, *Candida membranifaciens*, *Cystobasidium minutum*, *Debaryomyces hansenii*, *Filobasidium magnum*, *Metschnikowia koreensi*, *Naganishia albida*, *Ogataea zsoitii*, *Papiliotrema flavescens*, *Rhodotorula glutinis*, *R. mucilaginosa* and *Sporobolomyces ruberrimus*. Among them, four species *i.e.* *O. zsoitii*, *M. koreensi*, *P. flavescens*, *C. minutum* are new records to the Iranian mycoflora. All yeasts were described by macroscopic and microscopic morphological characters including colony color and shape; cell size and shape; and by location of isolation.

Keywords: yeast, biodiversity, plant surface, biocontrol
