مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۱، ۱۳۹۰ (۴۱-۳۳)

شناسایی گونه‌های مخمری جنس *Rhodotorula* جداشده از میوه سیب با استفاده از روش‌های مولکولی

مونا مختاری[۱]، حسن‌رضا اعتباریان[۲]، محمد رضوی[۳] و سیدحسین میرهندی[۴]*
۱، ۲، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد پردیس کشاورزی ابوریحان دانشگاه تهران ۳، استادیار مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، ۴، دانشیار دانشکده بهداشت و مؤسسه ملی تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۲۷ - تاریخ تصویب: ۸۹/۱۲/۴)

چکیده

برخی از مخمرها در کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای پس از برداشت میوه‌ها، نقش مهمی دارند. از جمله گونه‌های متعلق به جنس‌های *Pichia*، *Candida*، *Rhodotorula* واجد خواص آنتاگونیستی روی بیماری‌های کپک آبی سیب (*Penicillium expansum*) و کپک خاکستری سیب (*Botrytis mali*) می‌باشند. شناسایی دقیق و قطعی مخمرها پایه اولیه و ضروری هر پژوهش روی آنهاست. به علت مشکلات متعدد در روش‌های ارزیابی مورفولوژیک و فیزیولوژیک، امروزه روش‌های مولکولی توسعه یافته است. مطالعه حاضر به منظور شناسایی ۳۲ جدایه مخمر جدا شده از میوه سیب صورت گرفت. نواحی ITS و ITS2 به روش PCR، تکثیر و با توجه به تفاوت اندازه باندی محصولات PCR- FSP (fragment size polymorphism) گروه‌بندی اولیه انجام شد. الگوی الکتروفورتیک جدایه‌ها با استرین *Rhodotorula mucilaginosa* مرجع که توسط CBS شناسایی شده بود مقایسه گردید و مخمرهای جنس *Rhodotorula* تشخیص داده شد. تفکیک دقیق‌تر و نهایی گونه‌ها با استفاده از تعیین توالی ناحیه ITS آنالیز و Blast به عنوان روش تکمیلی انجام شد. چهار جدایه متعلق به جنس *Rhodotorula* تشخیص داده شدند که سه گونه آن *R. mucilaginosa* و یک گونه آن *R.. glutinis* تشخیص داده شد. به نظر می‌رسد که روش‌های مولکولی ارزان و ساده‌ای همچون PCR-FSP همراه با دیگر روش‌های شناسایی برای افتراق اولیه گونه‌های *Rhodotorula* مفید می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: توالی‌یابی ITS، گونه‌های *Rhodotorula*، سیب، PCR- FSP.

مقدمه

مخمرها قارچ‌های تک سلولی هستند که رشد رویشی آنها عمدتاً به روش جوانه‌زنی و ندرتاً به طریق تقسیم دوتایی انجام می‌شود. مخمرها با استفاده از قندها، اسید کربنیک و الکل تولید می‌کنند و از اینرو در تولید نان و طیف وسیعی از تولیدات صنایع غذایی نقش بسزایی دارند. این گروه از قارچ‌ها در طبیعت روی سطوح میوه‌ها و سبزیجات به طور گسترده وجود دارند و بعضاً نسبت به نور خورشید و خشکی مقاوم هستند (Pitt & Hocking, 1997). طبق گزارش Barnett *et al.* (1990)، ۸۱ جنس و ۵۹۷ گونه از مخمرها پذیرفته شده است. تعدادی دیگر از آنها مانند گونه‌هایی از جنس

* نویسنده مسئول: سید حسین میرهندی
E- mail: mirhendi@tums.ac.ir

Candida بیماریزای انسانی هستند و تعدادی نیز به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی پس از برداشت نقش مهمی را ایفا می‌کنند. (Gholamnejad *et al.*, 2009). مخمر *Candida oleophila* نیز به عنوان یک عامل بیوکنترل بیماری‌های پس از برداشت تحت عنوان Aspire TM توسط آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا در ایالات متحده ثبت شده است (EL- Neshawy, 1997). در ایران بررسی خاصیت آنتاگونیستی مخمرهای *Rhodotorula musilaginosa* و *Pichia guillindermonii* روی بیماری‌های سیب در ۲۰۰۹ صورت گرفت (Gholamnejad *et al.*, 2009). تعدادی از محققین نیز روی خواص بیولوژیک مخمرها از جمله *Rhodotorula* مانند *R. glutinis* و *R. mucilaginosa* جهت کنترل بیماری‌های پس از برداشت مانند کپک آبی سیب مطالعه کرده‌اند (Zhang *et al*., 2008; He *et al*., 2003).

بدیهی است تعیین هویت این عوامل، اساس و ضرورت اولیه همه این مطالعات است. شناسایی مخمرها در چند دهه قبل توسط روش‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی صورت می‌گرفت. گاهی حدود ۹۰ آزمایش در رابطه با شناسایی یک گونه مورد نیاز است که عملاً از لحاظ وقت و هزینه مقرون به صرفه نمی‌باشد (Deak., 1995). جذب ترکیبات کربنی یا نیتراته، تولید اسید از گلوکز، تخمیر قندها، تولید کلامیدوسپور، آسکوسپور و یا بازیدیوسپور از جمله آزمایش‌های مهم فنوتیپی مربوطه می‌باشند (Kreger- Van Rij, 1998).

با وجود اینکه در صورت لزوم این روش‌ها می‌توانند به عنوان روش‌های تکمیلی در شناسایی گونه‌ها مورد استفاده قرار گیرند (Lopandic *et al*., 2006)، با توجه به این محدودیت‌ها، اخیراً محققین به روش‌های تشخیصی مبتنی بر تفاوت‌های موجود در مولکول DNA پرداخته‌اند. تکنیک‌های متعددی برای این هدف به کار رفته است. از جمله شناسایی سریع گونه‌های مخمری مشروبات الکلی بر اساس آنالیز RFLP Restriction (Fragment Length Polymorphism) روی ناحیه ITS (Internal transcribed spacer) ریبوزومی انجام شده است. در آن تحقیق تعداد ۳۳ گونه از مخمرهای مشروب بر اساس نواحی ژنومی ITS 1 و ITS 2 و 5/8S بررسی شدند .محصول PCR از این ژن‌ها تنوع طولی زیادی داشت. اندازه‌های متفاوت محصولات PCR و آنالیز باندهای حاصل از ۳ آنزیم اندونوکلئاز HinfI، CfoI، HaeIII توانست گونه‌هایی از *Candida*، *Hanseniospora*، *Pichia*، *Rhodotorula*، *Saccharomyces*، *Schizosaccharomyces* و *Brettanomyces* را از هم تفکیک کند (Guillamón *et al*., 1998).

در بررسی دیگر شناسایی مخمرهای تولیدکننده محصولات لبنی با استفاده از تکنیک‌های تلفیقی مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی و همچنین ژنتیکی شامل توالی‌یابی ناحیه D1/D2 مندرج در ژن 26s rRNA و نیز RAPD، (Random Amplification of Polymorphic DNA) روی ۵۱۳ جدایه صورت گرفت وگونه‌هایی از *Candida*، *Rhodotorula* و *Saccharomyces* جداسازی و شناسایی شدند (Lopandic *et al*., 2006).

با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در مورد استفاده از روش‌های ژنتیکی تشخیص گونه مخمرهای ساپروفیت سیب در ایران انجام نشده بود هدف تحقیق حاضر، جداسازی مخمرهای *Rhodotorula* از میوه سیب و شناسایی جدایه‌های *Rhodotorula* توسط روش‌های مولکولی مبتنی بر تفاوت اندازه مولکول‌های ITS1 و ITS2 و روش ITS-sequencing می‌باشد. نتایج این بررسی می‌تواند راهگشای مطالعات وسیع‌تر در رابطه با بیوتکنولوژی مخمرها و کاربردهای آن در صنایع غذایی و کشاورزی باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی مخمرها و بررسی های فنوتیپیک

در پاییز ۸۷ از باغات و سردخانه‌های شهرهای مختلف ایران اقدام به جمع‌آوری نمونه گردید. برگ و میوه‌های سیب طبق جدول ۱ جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه قطعاتی از پوست سیب سالم در ۱۵۰ سی‌سی آب مقطر استریل در ارلن به مدت ۳۰ دقیقه، با ۱۴۰ دور در دقیقه روی شیکر تکان داده شدند. سپس از آب ارلن به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر روی تشتک پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز

آگار (PDA) پخش شد و در انکوباتور ۲۸ درجه نگهداری شد. بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت پرگنه‌های مختلف روی تشتک پتری رشد کردند که جداسازی و خالص سازی شدند. در مجموع تعداد ۳۴ جدایه مخمر از روی انواع مختلف میوه‌های سیب برداشت شده از مناطق دماوند، قزوین، کرمان، شیراز، ارومیه، کرج، تهران، کاشان، یزد جداسازی شد. برای شناسایی دقیق‌تر روی محیط کشت کروم آگار (Chromagar Candida, France) نیز کشت داده شدند و بعد از ۴۸ ساعت رنگ و شکل پرگنه جهت بررسی‌های فنوتیپیک مشاهده و ثبت گردید (Sivakumar *et al*., 2008; Kreger- Van Rij 1998). جدایه‌ها تحت عنوان M با شماره‌های مختلف برای مطالعات بعدی در فریزر ۲۰- نگهداری شدند. در این مطالعه همچنین دو استرین استاندارد به نام‌های A1 و A7 مورد استفاده قرار گرفت.

تکثیر DNA به روش PCR- FSP

در این بررسی نیز از نشانگر PCR- FSP که مبتنی بر تفاوت موجود در قطعات متعدد مورد بررسی است،

جدول ۱- جدایه‌های جمع‌آوری شده از سیب و ارقام مختلف آن، مکان و تاریخ جمع‌آوری و نام جمع‌آوری‌کننده

تاریخ جمع‌آوری و جمع‌آوری‌کننده	مکان جمع‌آوری	رقم میوه یا برگ سیب	شماره جدایه‌ها
پاییز ۸۷- مختاری	یزد	سیب زرد گلدن دلیشز	M12
پاییز ۸۷- مختاری	یزد	سیب زرد گلدن دلیشز	M13
پاییز ۸۷- مختاری	دماوند	برگ سیب گرانی اسمیت	M14
پاییز ۸۷- مختاری	دماوند	میوه سیب گرانی اسمیت	M15
پاییز ۸۷- مختاری	دماوند	میوه سیب گالار	M16
پاییز ۸۷- مختاری	دماوند	برگ سیب گلاب	M17
پاییز ۸۷- مختاری	دماوند	برگ سیب گلاب	M18
پاییز ۸۷- مختاری	دماوند	میوه سیب گلاب	M19
پاییز ۸۷- مختاری	دماوند	میوه سیب لنگرودی	M20
پاییز ۸۷- مختاری	دماوند	برگ میوه لنگرودی	M21
پاییز ۸۷- مختاری	ایوانکی	میوه سیب رد دلیشز	M22
پاییز ۸۷- مختاری	ایوانکی	میوه سیب رد دلیشز	M23
پاییز ۸۷- مختاری	قزوین	میوه سیب گلدن دلیشز	M24
پاییز ۸۷- مختاری	پاکدشت	میوه سیب سبز	M25
پاییز ۸۷- مختاری	پاکدشت	میوه سیب رد دلیشز	M26
پاییز ۸۷- مختاری	شیراز	میوه سیب گلاب	M27
پاییز ۸۷- مختاری	ارومیه	میوه سیب گلدن دلیشز	M28
پاییز ۸۷- مختاری	ارومیه	میوه سیب گلدن دلیشز	M29
پاییز ۸۷- مختاری	ارومیه	میوه سیب گلدن دلیشز	M30
پاییز ۸۷- مختاری	تهران	میوه سیب گلدن دلیشز	M31
پاییز ۸۷- مختاری	تهران	میوه سیب رد دلیشز	M32
پاییز ۸۷- مختاری	کرمان	میوه سیب گلاب	M33
پاییز ۸۷- مختاری	کرمان	میوه سیب گلاب	M34
پاییز ۸۷- مختاری	کاشان	میوه سیب گلدن دلیشز	M35
پاییز ۸۶- غلامنژاد	دماوند	میوه سیب گلدن دلیشز	M36
پاییز ۸۶- غلامنژاد	دماوند	میوه سیب رد دلیشز	M37
پاییز ۸۶- غلامنژاد	دماوند	میوه سیب رد دلیشز	M38
پاییز ۸۶- غلامنژاد	دماوند	میوه سیب رد دلیشز	M39
پاییز ۸۷- مختاری	محمدشهر کرج	میوه سیب گلدن دلیشز	M40
پاییز ۸۷- مختاری	مهرشهر کرج	میوه سیب گلدن دلیشز	M3
پاییز ۸۶	کرج	مؤسسه بیوتکنولوژی	M8
پاییز ۸۶	کرج	مؤسسه بیوتکنولوژی	M9
پاییز ۸۶	کرج	مؤسسه بیوتکنولوژی	M10
پاییز ۸۶	کرج	مؤسسه بیوتکنولوژی	M11
استاندارد. CBS	کرج	میوه سیب گلدن دلیشز	A1
استاندارد. CBS	کرج	میوه سیب گلدن دلیشز	A7

استفاده شد (Mirhendi *et al.*, 2008; Diaz & Fell., 2000; Kurtzman., 1998). برای این منظور از آغازگرهای زیر استفاده شد:

ITS1: (5'- TCCGTAGGTGAAC CTGCGG- 3')
ITS2: (5'- GC TGCGTTCTTCATCGATGC- 3')
ITS3: (5'- GCATCGATGAAGAACGCAGC- 3')
ITS4: (5- TCCTCCGCTTAT TGATATGC- 3)

پرایمر ITS1 به عنوان آغازگر جلوبر (Forward) و آغازگرITS2 به عنوان آغازگر عقب بر (Reverse) برای تکثیر قطعه ITS (حدود ۴۵۰-۲۵۰) و آغازگرهای ITS3 و ITS4 برای تکثیر قطعه ITS2 (حدود۴۲۰-۱۸۰) در دو واکنش جداگانه استفاده شد.

مخلوط اولیه برای واکنش PCR به صورت (10x) PCR buffer به مقدار ۲/۵ میکرولیتر، آغازگرهای Forward و Reverse به میزان ۲۵pmol، dNTPs به غلظت ۲۰۰ میکرومولار، Taq DNA polymerase به مقدار ۱/۵ واحد تهیه و حجم واکنش PCR با آب مقطر دوبار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. همچنین به مقدار نوک سرسمپلر از پرگنه تازه مخمر (معادل حجم ۳ میکرولیتر) به مخلوط مذکور اضافه گردید. از آنجا که این روش مستلزم استخراج و تخلیص قبلی DNA از مخمر نمی‌باشد، روش سریع‌تر و کارآمدتری است (Mirhendi *et al*., 2007) برنامه چرخه دمایی PCR به صورت ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۶ دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه DNA (Initial denaturation)، دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی (Denaturation)، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه جهت اتصال پرایمرها به DNA (Aannealing)، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه جهت بسط (Extension) آغازگرها، تنظیم گردید و این برنامه جمعاً ۳۰ چرخه انجام شد. نهایتاً بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گردید.

برای PCR-FSP از هر جدایه یک ویال ۰/۲ میکرولیتری حاوی آغازگرهای ITS1 و ITS2 و ویال دوم حاوی پرایمرهای ITS3 و ITS4 جهت PCR در نظر گرفته شد. پس از PCR از ویال اول به مقدار ۵ میکرولیتر و از ویال دوم نیز ۵ میکرولیتر از محصول PCR برداشته و با هم مخلوط گردید و همراه با ۳ میکرولیتر از بافر بارگذاری در هر چاهک ژل الکتروفورز ریخته شد. محصول PCR روی ژل ۱/۵٪ آگارز بارگذاری شد و با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۱ ساعت در دستگاه الکتروفورز از ژل عبور داده شد. ژل مذکور توسط دستگاه ترانس‌الومیناتور دوربین‌دار (UV-doc England) با استفاده از اشعه UV مشاهده و عکس برداری گردید. در نهایت الگوی باندی DNA تکثیر شده مربوط به دو ناحیه ITS و ITS2 در جدایه‌ها در مقایسه با باندهای نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (100 bp DNA Ladder)، که همزمان با نمونه‌ها روی ژل الکتروفورز شد مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های با وزن مولکولی ITS1 و ITS2 مشابه، در یک گروه قرار گرفتند و همه جدایه‌ها در گروه‌های مربوطه تقسیم‌بندی شدند. برای شناسایی *Rhodotorula mucilaginosa* از استرین‌های استاندارد که در سال ۲۰۰۸ توسط سرویس شناسایی CBS هلند شناسایی گردیده بود استفاده شد و جدایه‌های مورد بررسی با این جدایه استاندارد مقایسه شدند. تعدادی از جدایه‌هایی که در گروه جدایه‌های استاندارد *Rhodotorula mucilaginosa* قرار گرفتند جهت تعیین توالی انتخاب شدند.

تعیین توالی ناحیه ITS

چهار جدایه M18، M16، M34 و M24، که الگوی باندی مشابه با *R. mucilaginosa* داشتند انتخاب شده و با آغازگرهای ITS 1 و ITS4، PCR شدند و ناحیه ژنومی شامل ITS1-5.8 S-ITS2 تکثیر و برای توالی‌یابی به شرکت زیست فن‌آوری کوثر ارسال شد. نتایج تعیین توالی، با استفاده از نرم‌افزار BLAST با داده‌های موجود در بانک ژن مقایسه و گونه‌های مخمری تشخیص داده شد.

مقایسه توالی‌ها و مطالعات فیلوژنتیکی

توالی‌های جدایه‌های مورد بررسی به همراه تعدادی از توالی‌های گونه‌های مشابه به دست آمده از بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Clustal X1.83 همردیف و همسانه‌سازی شدند (Thampson *et al.*, 1997). نتایج روی نرم‌افزار فیلوژنی MEGA4 تجزیه و تحلیل شد. با استفاده از روش Neighbor- Joining و با تکرار ۱۰۰۰ بار bootstrap شجره فیلوژنی رسم شد (Kumar *et al*., 2004).

نتایج

بررسی‌های فنوتیپیک

مخمرهای جدا شده با استفاده از رنگ پرگنه روی محیط کشت‌های PDA و Chromagar از هم تفکیک شدند که جدایه‌های توالی‌یابی شده، روی هر دو محیط کشت رنگ‌های پرگنه صورتی و زرشکی ایجاد کردند که به تولید رنگدانه در گونه‌های *Rhodotorula* برمی‌گردد. نتایج این آزمایشات در جدول ۲ به همراه نتایج مطالعات مولکولی آورده شده است.

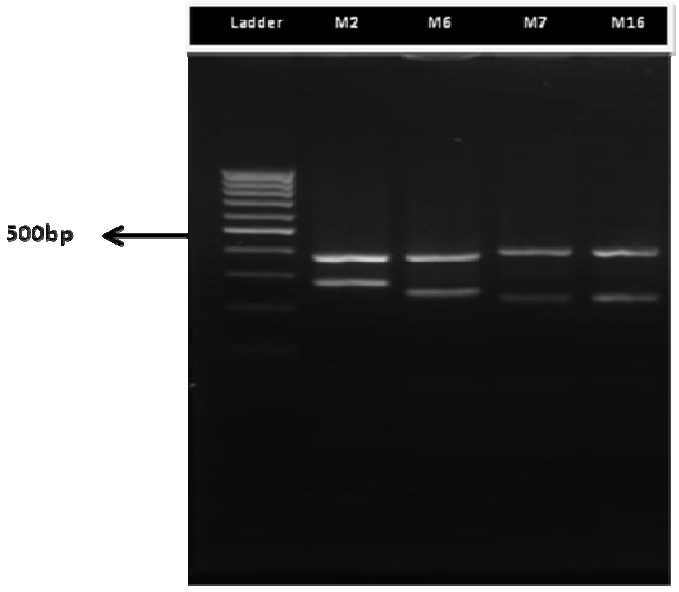
بررسی‌های مولکولی با استفاده از روش PCR- FSP

جدایه‌های مخمری مبنی بر الگوی باندی PCR-FSP در ۶ گروه قرار گرفتند که با مقایسه الگوهای الکتروفورتیک جدایه‌های استاندارد، گروه‌بندی شدند. شکل ۱ ژل الکتروفورز حاوی الگوی باندی PCR- FSP مربوط به ۴ جدایه را نشان می‌دهد که جدایه *R. mucilaginosa* استاندارد (A7) با جدایه M16 در این تحقیق الگوی مشابه نشان دادند. از بین ۳۲ جدایه، در ۱۰ جدایه قطعات DNA با وزن مولکولی 390bp (ITS1) و 230bp (ITS2) تکثیر گردید که همراه با جدایه استاندارد که الگوی مشابه داشت در یک گروه قرار گرفتند. چهار جدایه از این گروه که از نظر رنگ پرگنه کمی متفاوت بودند جهت توالی‌یابی انتخاب شدند که نتایج آزمایشات مولکولی و توالی‌یابی در جدول ۲ آمده است.

نتایج تعیین توالی ناحیه ITS

پس از آنالیز نتایج تعیین توالی، جدایه‌ها به قرار زیر شناسایی شدند:

جدایه M3 با استرین‌های‌مخمری *R. mucilaginosa* بانک ژن با شماره‌های دسترسی AF444612.1، EU177580.1، FJ515212.1 به میزان ۹۸٪ تشابه داشت. جدایه M16 با جدایه‌های *R. mucilaginosa* از بانک ژن با شماره‌های دسترسی EU871493.1، EU871491.1، EU871490.1 بالاترین میزان تشابه (۹۸٪) را نشان داد. جدایه M18 با جدایه‌های *R. mucilaginosa* از بانک ژن با شماره‌های دسترسی EU871493.1، EU871492.1، EU871491.1 بالاترین میزان تشابه (۹۸٪) را داشت. جدایه M34 نیز با جدایه‌های *R. mucilaginosa* از بانک ژن با شماره‌های دسترسی AF444613.1، FJ515212.1، AF444614.1 میزان تشابه ۹۹٪ را نشان داد. از نتایج چنین بر می‌آید که جدایه‌های M34، M18، M16 و M3 با جدایه‌های گونه‌های *R. mucilaginosa* موجود در بانک ژن از جهت توالی ITS1.5/8S.ITS2 درصد تشابه بالایی داشته‌اند. لذا این جدایه‌ها متعلق به گونه *R. mucilaginosa* معرفی



شکل ۱- نمونه‌ای ازالگوی الکتروفورتیک مربوط به ۴ مخمر جدا شده از سیب: M2 و M6 جدایه‌های متفاوتند که در گروه‌های متفاوت از هم و متفاوت از جدایه استاندارد قرار گرفتند. جدایه M7 جدایه استاندارد گونه *R. mucilaginosa* می‌باشد و واجد باندهای ۲۳۰ و ۳۹۰ جفت بازی است.

می‌گردند (جدول۲).

جدایه‌های M34 (از سیب کرمان)، M۲۴ (از سیب قزوین)، M۱۸ (از سیب گلاب دماوند)، M۱۶ (از سیب گالار دماوند)، و جدایه M3 (از سیب کرج) از بین مخمرهای گروه‌بندی شده دارای باندهای مشابه با جدایه‌های A1 و A7 بودند که قبلاً توسط CBS، به عنوان گونه *R mucilaginosa* شناسایی شده بودند.

بنابراین ۴ جدایه کاملاً مشابه و متعلق به *R. mucilaginosa* بودند و تنها یک جدایه به عنوان گونه *R. glutinis* شناسایی شد.

نتایج فیلوژنی

جدایه‌های مربوط به این تحقیق و چند جدایه منتخب از بانک ژن با استفاده از نرم‌افزارهای Clustal X 1.83 و نرم‌افزار فیلوژنی MEGA4 با روش UPGMA و ۱۰۰۰ بار تکرار درجه اعتبار bootstrap آنالیز گردید که در شکل ۲ آورده شده است.

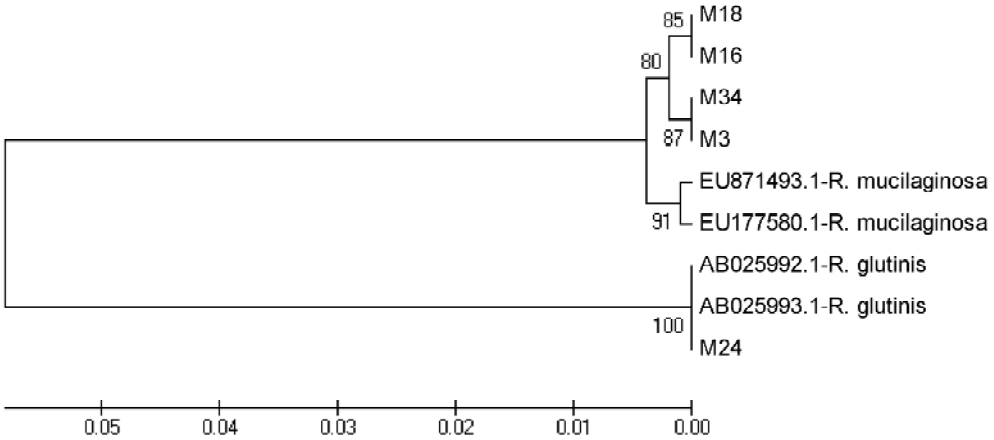
نتایج مقایسه توالی نواحی ITS1 و ITS2 جدایه‌های مورد بررسی با توالی جدایه‌های *R. mucilaginosa* و *R. glutinis* اخذ شده از بانک ژن نشان داد که جدایه‌های M3, M34 و M18, M16 به همراه جدایه‌های Eu871493 و Eu177580 در گروه *R. mucilaginosa* و جدایه M24 با AB025993 و AB025992 گونه *R. glutinis* با 100٪ درجه اعتبار (بوت استرپ) در یک گروه قرار گرفتند که نشانگر توانایی این روش در تشخیص گونه‌های *Rhodotorula* می‌باشد.

بحث

از نتایج چنین بر می‌آید که تفاوت رنگ و شکل کلونی‌ها روی محیط کشت نمی‌تواند تمایز بین گونه‌ای ایجاد کند. چرا که ویژگی‌های مورفولوژیک وابسته به شرایط محیط کشت و محیط اطراف می‌باشد و نمی‌توانند در شناسایی گونه‌ها اعتبار کافی داشته باشند

جدول ۲- مقایسه توالی ناحیه تکثیر شده ITS1 و ITS2 جدایه‌های مخمری سیب با جدایه استاندارد با استفاده از نرم‌افزار BLAST برای شناسایی *Rhodotorula*

نتیجه آنالیز به کمک بلاست توالی‌ها	درصد همولوژی توالی جدایه‌ها با جدایه‌های موجود در بانک ژن	سایز باندهای الکتروفورزی	رنگ پرگنه مخمر روی کروم آگار	رنگ پرگنه مخمر روی PDA	جدایه
R.mucilaginosa	٪۹۸	۲۳۰ و ۳۹۰	صورتی زرشکی	نارنجی پررنگ	M16
R.mucilaginosa	٪۹۸	۲۳۰ و ۳۹۰	صورتی ارغوانی	نارنجی پررنگ	M18
R.mucilaginosa	٪۹۹	۲۳۰ و ۳۹۰	بنفش کم رنگ	نارنجی پررنگ	M34
R.glutinis	٪۹۹	۲۳۰ و ۳۹۰	رشد ضعیف	صورتی گلبهی	M24
R.mucilaginosa	٪۹۸	۲۳۰ و ۳۹۰	صورتی	نارنجی پررنگ	M3
R.mucilaginosa	٪۹۹	۲۳۰ و ۳۹۰	بنفش صورتی	نارنجی پررنگ	Reference



شکل ۲- دندروگرام فیلوژنی حاصل از آنالیز توالی ژنی ناحیه ITS1, 5.8S, ITS2 به روش UPGMA با تکرار ۱۰۰۰ بار درجه اعتبار Bootstrap در جدایه‌های *Rhodotorula mucilaginosa* و *Rhodotorula glutinis*

(Yamamoto *et al*., 1991). همچنین برخی محققین به برتری تکنیک‌های مولکولی نسبت به روش‌های مورفولوژی و فیزیولوژی از حیث دقت و اعتبار اشاره کردند (Lopandic *et al*., 2006).

در سال ۲۰۰۸ مخمرهای بیماریزای کاندیدیایی انسانی با استفاده از روش PCR- FSP در حد گونه شناسایی شدند که این روش یکی از متدهای ساده و ارزان برای شناسایی مخمرها معرفی گردید (Mirhendi *et al*., 2008). در بررسی حاضر نیز مشاهده گردید که مخمرها از جمله جنس *Rhodotorula*ها را می‌توان با روش‌های PCR- FSP و مقایسه با جدایه‌های استاندارد شناسایی و از دیگر مخمرها متمایز کرد.

در مطالعه حاضر جدایه‌های با باند ۲۳۰ و ۳۹۰ شامل دو رنگ سفید و صورتی از مخمرها بودند که با توجه به تولید رنگدانه در جنس *Rhodotorula* جدایه‌های سفیدرنگ از این گروه حذف شدند (Kreger-Van Rij 1998). گونه *R. mucilaginosa* روی محیط کشتPDA نارنجی پررنگ و *R. glutinis* صورتی گلبهی می‌باشد.

مخمرهای با باند مشابه *Rhodotorula* اما سفید رنگ، احتمالاً گونه متفاوتی از مخمرها را تشکیل می‌دهد. در مورد مخمرهای *Rhodotorula*، چنین به نظر می‌رسد که گونه‌های مختلف این جنس، اندازه قطعات ITS یکسان اما متمایز از بقیه جنس‌ها دارند. و لذا می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که نشانگر PCR-FSP برای *Rhodotorula*ها تفکیک در سطح جنس را به خوبی انجام می‌دهد اما برای تفکیک گونه کافی نیست.

در سیب گلاب دماوند از روی میوه آن دو جدایه M18 و M17 و از روی برگ آن جدایه M19 جدا گردید. دو جدایه M17 و M19 در یک گروه الکتروفورتیک PCR- FSP قرار گرفتند که به نظر می‌رسد این دو گونه مخمری بسیار نزدیک به هم و حتی ممکن است هر دو یک گونه باشند.

اما جدایه M18 که از روی برگ همان سیب جدا شد پس از تعیین توالی به عنوان گونه *R. mucilaginosa* معرفی گردید. اینکه این جدایه از میوه این سیب جدا نشد ممکن است به شرایط تغذیه‌ای میوه و برگ برگردد و مستلزم آزمایش‌های بیشتری است. دیگر اینکه دو جدایه M17 و M19 یکی از روی میوه و یکی از روی برگ سیب جدا شد که می‌تواند بیانگر این باشد که منبع تغذیه‌ای و یا شرایط محیطی برای رشد این مخمر در هر دو حالت در شرایط اپتیمم بوده است. احتمالاً این گونه مخمری از نظر غذایی بسیار کم توقع باشد همچنانکه ما نیز این گونه‌ها را از تمامی ارقام سیب‌ها جدا کرده‌ایم.

جدایه M16 که از سیب گالار دماوند جداشده بود با جدایه M18 که از سیب گلاب دماوند جداشده بود بیشترین شباهت را در شجره فیلوژنتیکی نشان دادند. از این نتایج می‌توان چنین برداشت کرد که شرایط مشترک اقلیمی آنها سبب سازگاری محیطی به ویژه از حیث ژنتیکی گردیده است. از طرفی جدایه M34 و M3 که به ترتیب از سیب‌های گلدن دلیشز کرمان و گلدن دلیشز کرج جدا شده بودند نیز در نزدیک‌ترین مکان فیلوژنتیکی با ۸۷٪ درجه اعتبار (بوت استرپ) نسبت به هم قرار گرفتند. این نتیجه را نیز ممکن است بتوانیم به رقم مشترک این دو سیب (گلدن دلیشز) نسبت دهیم. چنانچه واضح است که موقعیت جغرافیایی این دو مکان بسیار از هم دور است ممکن است شرایط آب و هوایی و اقلیمی برای رشد این گونه از مخمر روی سیب در این دو مکان مشابه باشد.

همچنین با استفاده از نرم‌افزار Clustal W میزان تشابه توالی جدایه‌های M3 و M34 نسبت به هم ۹۸/۲٪ نشان داده شد. جدایه‌های ۱۶ و ۱۸ نیز ۹۷/۵٪ تشابه توالی را نشان دادند. لذا به ترتیب با میزان تفاوت ۱/۸٪ و ۲/۵٪ دو جدایه M34 و M3 بیشترین تشابه را دارند و جدایه‌های M16 و M18 نیز بالاترین میزان تشابه را در بین جدایه‌ها نشان دادند. جدایه‌های M40، M27 و M23 نیز در گروه الگوی الکتروفورتیک ۲۳۰ و ۳۹۰ قرار داشتند. با توجه به نتایج توالی‌یابی جدایه‌های مشابه، پیش‌بینی می‌شود این جدایه‌ها نیز یکی از گونه‌های *R. mucilaginosa* و یا *R. glutinis* باشند.

با توجه به محدودیت‌های روش تعیین توالی از حیث وقت و هزینه برای شناسایی دقیق و سریع این مخمرها در حد گونه بایستی از روش‌های دیگر مثل فیزیولوژیک یا مورفولوژیک و یا مارکرهای مولکولی بیشتری مانند PCR- RFLP و یا RAPD در مطالعات بعدی استفاده

شود و با مزایا و معایب روش PCR- FSP مقایسه گردد.

در این راستا شناسایی مخمرها توسط روش RFLP روی 5.8 srRNA و ۲ ناحیه از ITS و توسط ۳ آنزیم اندونوکلئاز *HaeIII*، *HinfI* و *CfoI* در سال ۱۹۹۹ انجام شد، ۱۳۲ گونه مخمر مربوط به ۲۵ جنس شناسایی و جداسازی و گونه‌هایی از جنس‌های *Saccharomyces*، *Schizosaccharomyces*، *Zygosaccahromyces*، *Torulaspora*، *Hanseniospora*، *Metchnikowia*، *Pichia*، *Kluyveromyces*، *Cryptococcus*، *Rhodotorula*، *Debaromyces* و *Candida* شناسایی شد (Esteve-Zarzoso *et al*., 1999).

با توجه به آنالیزهای فیلوژنی در روش Neighbor-joining گونه‌های *R. mucilaginosa* از بانک ژن با جدایه‌های *R. mucilaginosa* مورد بررسی در این تحقیق در یک گروه قرار گرفتند. همچنین گونه‌های *R. glutinis* از بانک ژن با *R. glutinis* مورد بررسی در این تحقیق با ۱۰۰٪ درجه اعتبار (بوت استرپ) در یک گروه قرار گرفتند که نشان می‌دهد جدایه‌های مربوط به یک گونه از نظر ژنتیکی و فیلوژنی بسیار به هم شبیه هستند. همچنین کل جدایه‌ها از یک ریشه منشأ گرفتند که نشان‌دهنده نزدیکی گونه‌ها و تأیید نتایج مولکولی می‌باشد. جدایه‌های M18، M16، M34 و M3 نسبت به جدایه‌های مشابه از بانک ژن یعنی EU871493.1 و EU177580.1 نزدیک‌تر می‌باشند و در یک گروه جداگانه قرار گرفتند که احتمال دارد به علت تشابه جغرافیایی و ژنتیکی جدایه‌های این بررسی باشد که بحث و بررسی بیشتری را می‌طلبد.

پیشنهاد می‌شود محققین روی خواص بیولوژیک گونه *R. glutinis* و گونه‌های دیگر این جنس نیز تحقیقات بیشتری به عمل آورده، روش‌های مولکولی ساده‌تر و ارزان‌تری جهت شناسایی گونه‌های *Rhodotorula* به کار برند و همچنین روابط فیلوژنتیکی مربوط به آنها را با داده‌های اخیر مقایسه نمایند.

REFERENCES

1. Barnett, J. A., Payne, R. W. & Yarrow, D. (1990). *Yeasts: characterization and identification*. (2nd ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
2. Deak, T. (1995). Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 287-292.
3. Diaz, M. R. & Fell, J. W. (2000). Molecular analysis of ITS and IGS rDNA regions of the psychrophilic yeasts in the genus Mrakia. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77, 7-12.
4. EL-Neshawy, S. M. (1997). Nisin enhancement of biocontrol of postharvest disease of apple with *Candida oleophila*. *Postharvest Biology and Technology*, 10, 9-14.
5. Esteve- Zarzoso, B., Belloch, C. & Uruburul, F. A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.85 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329-337.
6. Gholamnejad, J., Etebarian, H. R., Sahebani, N. A. & Roustaee, A. (2009). Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Iran against blue mould of apple in order to reduce the environmental pollution. *Journal of Internal Environmental Application & Science*, 4, 28-36.
7. Guillamón, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. & Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169, 387–392.
8. He, D., Zheng, X., Yin, Y., Sun, P. & Zhang, H. (2003).Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 44, 211-216.
9. Kreger- van Rij, N. J. W. (1998). *The yeast: a taxonomic study*. (3rd ed.). Elsivier, Amsterdam.
10. Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). Integrated software for molecular evolutionary genetics gnalysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatic*, 5, 63-150.
11. Kurtzman, C. P. (1998). *The yeasts a taxonomic study*. (4th ed.). Elsevier, Amsterdam.
12. Lopandic, K., Zelgerb, S., Ba´Nszkyc, L. K., Eliskases-Lechnerd, F. & Prillingeraa, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23, 341-350.
13. Mirhendi, H., Diba, K., Rezaei, A., Jalalizand, N., Hosseinpur, L. & Khodadadi, H. (2007) .Colony-PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts. *Iranian Journal Public Health*, 36, 40- 44. (In Farsi).

14. Mirhendi, H., Shidfar, M., Kordbacheh, P., Hashemi, S. J., Moazeni, M., Hosseinpur, L. & Rezaie Matehkolaie, A. (2008). Identification of pathogenic *Candida* Species: PCR-fragment size polymorphism (PCR- FSP) method. *Tehran University Medical Journal*, 66, 639- 645. (In Farsi).
15. Pitt, J. I. & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and food spoilage*. (2nd ed.). Blackie Academic & Professional, London. 593pp.
16. Sivakumar, V. G., Shankar, P., Nalina, N. & Menon, T. (2008). Use of chromagar in the differentiation of common species of *Candida*. *Mycopathologia*, 167, 47- 49.
17. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24, 4876- 4882.
18. Thompson, J. D., Gibson, T. J. & Higgins, D. G. (2003). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics*, 2.3.1- 2.3.22
19. Yamamoto, N., Amemiya, H., Yokomori, Y., Shimizu, K. & Totsuka, A. (1991). Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 4, 358-363.
20. Zhang, H., Wang, L., Ma, L., Dong, Y., Jiang, S., Xu, B. & Zheng, X. (2008). Biocontrol of major postharvest pathogens on apple using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. *Biological Control*, 48, 79-83.