شناسایی مولکولی مخمرهای بازیدیومیستی در خاک‌های ایران*

دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۵ / پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۱۰

لاچین مختارنژاد✉: دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز (mokhtarnejad@ut.ac.ir)
مهدی ارزنلو: دانشیار قارچ‌شناسی و بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز
اسداله بابای اهری: استاد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز
بندتا تورکتی: استادیار گروه میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه پروجیا، ایتالیا

چکیده

در این مطالعه، تنوع زیستی مخمرهای بازیدیومیستی خاک‌های نواحی مختلف ایران مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، نمونه‌های خاک از عمق ۱۵-۵ سانتی‌متری جمع‌آوری و متعاقبا مخمرها جداسازی و خالص‌سازی شدند. گروه‌بندی اولیه جدایه‌های مخمر از طریق انگشت‌نگاری DNA با استفاده از MSP-PCR صورت گرفت. یک یا چند جدایه منتخب از هر گروه با استفاده از داده‌های توالی نواحی D1/D2، ژن ۲۶S rRNA و تست‌های فیزیولوژیک شناسایی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که تنوع قابل توجهی در مخمرهای بازیدیومیستی خاک‌های مناطق نمونه‌برداری شده وجود دارد. در این مقاله، تعداد ۲۵ گونه زیر متعلق به شش جنس نخستین بار برای مایکوبیوتای ایران معرفی می‌شوند: *Trichosporon pullulans*، *Rhodotorul mucilaginosa*، *R. minuta*، *R. lysiniphila*، *R. laryngis*، *Rhodosporidium kratochvilovae*، *Rh. babjevae*، *Holtermanniella takashimae*، *Fibulobasidium inconspicuum*، *Cryptococcus ramirezgomezianus*، *C. watticus*، *C. victoriae*، *C. uzbekistanensis*، *C. terreus*، *C. saitoi*، *C. podzolicus*، *C. oeirensis*، *C. friedmannii*، *C. flavescens*، *C. diffluens*، *C. bhutanensis*، *C. albidus*، *C. albidosimilis*، *C. aerius*، *C. adeliensis*. در بین جنس‌های شناسایی شده، *Cryptococcus* بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد و *C. aerius* به عنوان گونه غالب از تمام خاک‌های نمونه‌برداری شده جداسازی شد.

واژه‌های کلیدی: D1/D2، 26 rRNA gene، *Cryptococcus*، *Rhodosporidium*، *Rhodotorula*

Molecular identification of basidiomycetous yeasts from soils in Iran

Received: 14.02.2015 / Accepted: 31.05.2015

Lachin Mokhtarnejad✉: PhD Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran (mokhtarnejad@ut.ac.ir)

Mahdi Arzanlou: Associate Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Asadollah Babai-Ahari: Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Benedeta Turchetti: Assistant Prof., Department of applied Microbiology; University if Perugia, Italy

Summary

In the present study basidiomycetous yeast species were characterised from soil samples in different regions of Iran. Soil samples were collected from 5–15 cm depth, subsequently yeasts were isolated and purified. Yeast isolates were identified using D1/D2 domains of 26S rRNA and physiologic tests. The results of this study revealed a rich diversity amongst basidiomycetous yeast species in the sampled areas. In this paper we report and characterise 25 species belonging to six genera *viz*., *Trichosporon pullulans*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *R. minuta*, *R. lysiniphila*, *R. laryngis*, *Rhodosporidium kratochvilovae*, *R. babjevae*, *Holtermanniella takashimae*, *Fibulobasidium inconspicuum*, *Crytococcus ramirezgomezianus*, *Cryptococcus watticus*, *C. victoriae*, *C. uzbekistanensis*, *C. terreus*, *C. saitoi*, *C. podzolicus*, *C. oeirensis*, *C. friedmannii*, *C. flavescens*, *C. diffluens*, *C. bhutanensis*, *C. albidus*, *C. albidosimilis*, *C. aerius*, *C. adeliensis*. All of these species represent new records for the mycobiota of Iran. Members of the genus *Cryptococcus* were the most donimnat basidiomycetous yeast and *Cryptococcus aerius* was commonly isolated from all soil smaples as the dominat species.

Keywords: D1/D2, 26 rRNA gene, *Cryptococcus*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*

* بخشی از رساله دکترای نگارنده اول به راهنمایی دکتر مهدی ارزنلو و دکتر اسداله بابای اهری ارایه شده به دانشگاه تبریز

مقدمه

مخمرها از موجودات زنده بسیار مهم در صنایع تخمیری و غذایی بوده و به دلیل نقش و اثرات مهمی که در اکوسیستم و فعالیت‌های بشر دارند دارای اهمیت ویژه‌ای هستند. مخمرهای خاک به خاطر اهمیت آن‌ها از نظر کشاورزی، صنعت، محیط زیست و پزشکی، مورد توجه قرار گرفته‌اند (Lachance *et al*. 2001, Lee *et al*. 2001, Robiglio *et al*. 2011).

گونه‌های زیادی از مخمرها از محیط‌های طبیعی و مصنوعی جداسازی شده‌اند. بیشتر مطالعاتی که روی مخمرها انجام پذیرفته مربوط به تغییرات جمعیت و نقش آن‌ها در پروسه تخمیر مواد غذایی بوده است (Nunez *et al*. 1996, Strauss *et al*. 2001). مطالعه تنوع زیستی مخمرها در محیط‌های طبیعی به دلیل نقش کمرنگ‌تر آن‌ها در بیوسفر در مقایسه با بقیه موجودات زنده مانند بیمارگرها، شکارگرها یا عوامل مهم مؤثر در چرخه‌های زیستی، کمتر مورد توجه قرار گرفته است (Lachance & Starner 1998).

با پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی مولکولی، امکان شناسایی مخمرها و مطالعه تنوع زیستی آن‌ها با استفاده از داده‌های توالی نوکلئوتیدی امکان‌پذیر شده است. نتایج مطالعات گسترده فیلوژنتیکی روی مخمرهای آسکومیستی (Kurtzman & Robnett 1998) و مخمرهای بازیدیومیستی (Fell *et al*. 2000) نشان داده است که توالی ناحیه D1/D2 زیر واحد بزرگ اپرون آر.ان.ا ریبوزومی (26S rRNA) جهت تعیین حدود و ثغور گونه‌ها مناسب می‌باشد. بر این اساس، در مقایسه توالی نوکلئوتیدها جانشینی بیش از یک درصد در توالی۶۰۰ نوکلئوتیدی ناحیه D1/D2، احتمالا نشان دهنده ثغور گونه‌های متفاوت می‌باشد و تفاوت تا حدود سه نوکلئوتید سطوحی از تنوع درون گونه‌ای را نشان می‌دهد (Kurtzman & Robentt 1998). شناسایی مخمرها بر پایه معیار یک درصد جانشینی در توالی‌یابی D1/D2 در مقایسه با شناسایی براساس خصوصیات ریخت‌شناختی و اطلاعات فیزیولوژیکی بسیار سریع و قابل اطمینان‌تر است (Begerow *et al*. 1997). با وجود اینکه تجزیه و تحلیل داده‌های توالی برای شناسایی مخمرها و معرفی گونه‌های جدید بسیار سریع است اما برای توصیف گونه‌های جدید، خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی گونه نیز بایستی گزارش شوند (Kurtzman *et al*. 2011).

تنوع و پراکنش مخمرهای بازیدیومیستی در محیط‌های طبیعی نسبت به مخمرهای آسکومیستی بیشتر می‌باشد. شناسایی و تعیین موقعیت فیلوژنتیکی مخمرهای بازیدیومیستی به دلیل سطح بالای تغییرات درون گونه‌ای مشکل می‌باشد (Fell *et al*. 2000, Scorzetti *et al*. 2002, Fonseca *et al*. 2011). به عنوان مثال، اعضای جنس *Cryptococcus* پلی‌فیلتیک بوده و در چهار خوشه *Tremellales*، *Trichosporonales*، *Filobasidiales* و *Cystofilobasidiales* طبقه‌بندی می‌شوند (Scorzetti *et al*. 2001). در راسته *Tremellales*، جنس *Cryptococcus* بسیار ناهمگن بوده و احتمالا گونه‌های توصیف نشده متعددی را شامل می‌شود (Fell *et al*. 2000, Sampio *et al*. 2002, Scorzetti *et al*. 2002, Ina´cio *et al*. (2005, de Garcia *et al*. 2010.

جداسازی و شناسایی مخمرها از منابع مختلف می‌تواند برای استفاده در صنایع مختلف مفید و قابل توجه باشد. علیرغم تنوع اقلیمی موجود در سرزمین ایران، تاکنون مطالعه‌ای در زمینه شناسایی مخمرهای ایران صورت نگرفته است. در تحقیق حاضر، مخمرهای بازیدیومیستی در نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از برخی مناطق ایران شناسایی شده و آرایه‌های جدید برای میکوبیوتای ایران معرفی می شوند.

روش بررسی

۱- نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از خاک‌های مناطق مختلف کشور در بهار و تابستان سال ۱۳۹۲ و به صورت کاملا تصادفی صورت گرفت (جدول ۱). تعداد پنج نمونه از هر منطقه از اعماق ۵ تا ۱۵ سانتی‌متری خاک جمع‌آوری و با هم مخلوط شدند و بعد از ثبت مختصات جغرافیایی به آزمایشگاه منتقل شدند.

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی محل‌های نمونه‌برداری شده

Table 1. Geographical data of the sampling sites

Collection sites		Collection sites	
Arasbaran forests (E Azarbaijan)	N:38^0, 39’ 20” E:46^0, 35’,43”	Karaj	N:35^0, 52’ 54” E:50^0, 56’,36”
Ahar (E Azarbaijan)	N:38^0, 28’ 59” E:47^0, 02’,20”	Mashhad	N:36^0, 15’ 05” E:59^0, 47’,02”
Ardebil	N:38^0, 12’ 42” E:48^0, 18’,08”	Miandoab (W Aazarbaijan)	N:37^0, 02’ 15” E:46^0, 16’,37”
Abadan (Khuzestan)	N:30^0, 20’ 54” E:48^0, 15’,63”	Meshkin Shahr (E Azarbaijan)	N:38^0, 22’ 40” E:47^0, 40’,59”
Ardestan (Fars)	N:33^0, 22’ 19” E:52^0, 23’,10”	Makou	N:39^0, 17’ 35” E:44^0, 31’,03”
Ahvaz (Khuzestan)	N:31^0, 12’ 35” E:48^0, 20’,49”	Malekan (E Azarbaijan)	N:37^0, 35’ 03” E:46^0, 10’,15”
Bonab (E Azarbaijan)	N:37^0, 21’ 02” E:46^0, 05’,37”	Najaf abad	N:32^0, 39’ 27” E:51^0, 22’,38”
Guilan	N:37^0, 15’ 18” E:49^0, 38’,14”	Piranshahr (W Azarbaijan)	N:36^0, 41’ 28” E:45^0, 09’,64”
Gorgan	N:36^0, 47’ 65” E:54^0, 25’,18”	Salmas (W Azarbaijan)	N:38^0, 12’ 34” E:44^0, 44’,38”
Ghazvin	N:36^0, 18’ 44” E:49^0, 58’,34”	Shiraz (Fars)	N:29^0, 42’ 46” E:52^0, 29’,23”
Isfahan	N:32^0, 23’ 36” E:51^0, 15’,82”	Sanandaj (Kordestan)	N:35^0, 19’ 33” E:47^0, 01’,38”
Kerman	N:30^0, 14’ 49” E:57^0, 02’,50”	Tabriz (E Azarbaijan)	N:38^0, 02’ 93” E:46^0, 14’,25”
Kermanshah	N:34^0, 15’ 56” E:47^0, 02’,15”	Tehran	N:35^0, 26’ 37” E:51^0, 23’,36”
Khoy (W Azarbaijan)	N:38^0, 32’ 22” E:44^0, 54’,60”	Urmia (W Azarbaijan)	N:37^0, 29’ 34” E:44^0, 58’,78”
Kazeroun (Fars)	N:29^0, 37’ 24” E:51^0, 41’,48”	Yazd	N:31^0, 47’ 40” E:54^0, 20’,37”

۲- جداسازی مخمرها

برای جداسازی مخمر از خاک، ۱۰ گرم از نمونه‌ها در داخل ارلن ۲۰۰ میلی لیتر حاوی ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و به مدت یک ساعت روی شیکر انکوباتور قرار داده شد. سپس از هر نمونه سری رقت تهیه و از هر رقت یک میلی‌لیتر روی محیط کشت Dichloran Rose Bengal Agar + chloramphenicol (DRB) پخش گردید. تشتک‌های پتری به مدت ۳ تا ۴ هفته در دو انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس (برای جداسازی مخمرهای گرمادوست) و ۴ درجه سلسیوس (برای جداسازی مخمرهای سرمادوست) نگهداری شدند. پس از ظهور پرگنه‌های مخمر روی سطح محیط کشت، پرگنه‌هایی که از نظر شکل ظاهری و رنگ متفاوت بودند جهت خالص‌سازی به طور جداگانه به محیط کشت جدید منتقل شده و نگهداری گردیدند. خالص‌سازی نمونه با استفاده روش کشت خطی روی آگار صورت پذیرفت.

۳- شناسایی جدایه‌های مخمر

گروه‌بندی اولیه جدایه‌ها براساس خصوصیات ماکروسکوپی مانند رنگ و شکل پرگنه و همچنین خصوصیات میکروسکوپی انجام پذیرفت. به منظور بررسی خصوصیات ماکروسکوپی شامل رنگ و شکل پرگنه، جدایه‌های مخمر روی محیط کشت GYP آگار (glucose20 g/L, peptone 10 g/L, Yeast extract 10 g/L, Agar 20 g/L) کشت گردیدند.

- تست‌های فیزیولوژیک

آزمون‌های فیزیولوژیک استاندارد مطابق روش کورتزمن و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد. آزمون‌های مربوط به جذب منابع کربن و نیتروژن انتخابی روی محیط کشت GYP انجام گردید. برای آزمون رشد در محیط بدون ویتامین، نیم میلی‌لیتر از محیط کشت استاندارد (Bacto Vitamin-Free Yeast Base medium 10x) با ۴/۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط شد. تمام نمونه‌ها با ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمر با غلظت 10^6 ml $^{-1}$ تلقیح شدند. نمونه‌ها پس از تلقیح در محیط GYP به مدت چهار هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس

نگهداری شدند و هر هفته یک‌بار مورد بررسی قرار گرفتند (Kurtzman *et al*. 2011).

آزمون هیدولیز اوره با استفاده از محیط Christensen Urea Agar که به صورت شیب‌دار در لوله آزمایش تهیه گردید، انجام گرفت. پس از چهار روز نگهداری جدایه‌ها روی این محیط کشت، به لوله‌های آزمایش محلول اوره اضافه گردید. در صورت هیدرولیز اوره، رنگ محیط کشت به صورتی تغییر می‌یابد (Kurtzman *et al*. 2011).

شناسایی مولکولی مخمرها

- استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از روش بولانو و همکاران (۲۰۰۱) انجام گرفت. برای این منظور، از کشت ۴۸ ساعته جدایه‌ها روی محیط کشت YPD آگار استفاده شد. به داخل تیوب دو میلی‌لیتری حاوی ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده، ۱۰۰ میکرولیتر (تقریبا دو لوپ پر) بیوماس مخمر اضافه شد و سپس ۵۰۰ میکرولیتر فنول-کلروفرم به نسبت ۱:۱(pH۸/.) و ۱۵۰ میلی‌گرم مهره شیشه‌ای (glass bead) و به مدت سه دقیقه ورتکس شد. فاز رویی جدا شد و با حجم برابر با اتانول ۹۶ درصد با دمای صفر درجه مخلوط شد. بعد از نگهداری به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به منظور ته‌نشین کردن DNA، تیوب‌ها سانتریفیوژ شدند. فاز رویی دور ریخته شد و DNA ته‌نشین شده پس از خالص‌سازی به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس ۵ میکرولیتر از آن مستقیما برای انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت (Turchetti *et al*. 2008).

- انگشت نگاری DNA با استفاده از MSP-PCR

انگشت‌نگاری DNA با استفاده از دو آغازگر $(GTG)_5$ با توالی 5'- GTGGTGGTGGTGGTG و M13 با توالی 5' GAGGGTGGCGGTTCT انجام گرفت (Libkind *et al*. 2003). مخلوط واکنش PCR شامل بافر با غلظت 1x، $MgCl_2$ با غلظت ۲ میلی‌مول، dNTps با غلظت ۲۵۰ میکرومول از هر کدام، آنزیم Taq DNA Polymerase به میزان یک واحد بود. حجم واکنش با استفاده از آب مقطر دو بار استریل به ۲۵ میکرولیتر تنظیم (Meyer *et al.* 1993). تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Biometra® Gmbh, Goettingen, Germany) با اعمال چرخه‌های دمایی شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه برای واسرشت اولیه و ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه (واسرشت)، ۵۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه (اتصال آغازگر) و در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه (گسترش) و یک چرخه نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۴ درصد و بافر TAE در ولتاژ ۱۲۰ به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز شد. از نشانگر با وزن مولکولی 1 Kb (Mass Ruler ™ DNA ladder Mix, Fermentas Inc.) به عنوان شاخص استفاده شد. الگوهای باندی DNA در نمونه‌های مختلف با هم مقایسه شد و نمونه‌های با الگوی باندی کاملا مشابه در گروه‌های یکسان خوشه‌بندی شدند (Sampaio *et al.* 2001, Gadanho & Sampaio 2002).

- توالی‌یابی ناحیه D1/D2 اپرون 26S rRNA

یک یا چند جدایه از هر گروه به عنوان نماینده برای توالی‌یابی انتخاب شد. DNA در ابتدا با استفاده از آغازگرهای RCR3R با توالی (5′ - GGT CCG TGT TTC AAG AC- 3′) و V9 با توالی (5′ -TGCGTTGAT TAC GTC CCT 3′) تکثیر شد. برای توالی‌یابی از آغازگرهای NL1 با توالی (5' - GCA TAT CAA TAA GCG GAG 3') و با NL4 توالی (5′ - GGT CCG TGT TTC GAA AAG 3′) به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس استفاده شد (Libkind *et al*. 2003).

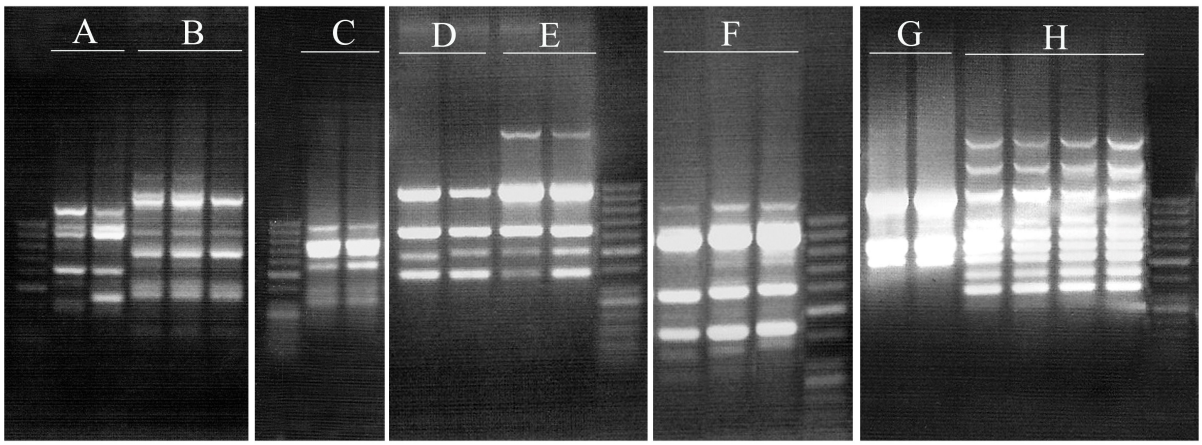
- توالی‌یابی و تبارزایی

واکنش ترادف‌یابی نوکلئوتیدی به وسیله کیت تجارتی بیگ‌دای BigDye ® Terminator V301 Cycle Sequencing kit ساخت کارخانه Applied Biosystems کالیفرنیا در ایالت متحده آمریکا و مطابق دستورالعمل کارخانه صورت گرفت. تجزیه تحلیل نتایج با استفاده از دستگاه ABI persim.® 3700 انجام شد. توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار SeqMan (Lasergene package, DNAstar, Madison, USA) بررسی و ویرایش شدند و سپس با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). رج‌بندی جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 انجام شد. درخت فیلوژنتیک نیز با نرم‌افزار MEGA5 و به روش پیوست‌همسایه ترسیم و روابط خویشاوندی جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. جهت حصول اطمینان از گروه‌بندی ایجاد شده، شاخص Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار اعمال و ارزش عددی آن به صورت درصد در بالای گروه‌ها ذکر شد. توالی جدایه‌های منتخب در بانک ژن ثبت گردید.

نتیجه و بحث

در این پژوهش، طبقه‌بندی اولیه مخمرهای جداسازی شده براساس رنگ پرگنه و تیپ جوانه‌زنی انجام شد و جدایه‌ها

در هشت گروه قرار گرفتند. اعضای زیرشاخه *Agaricomycotina* به طور معمول دارای پرگنه‌های کاملا گرد با حاشیه کامل، پرگنه‌های شفاف (درخشان) و دارای طیف رنگ کرمی، نارنجی تا صورتی کم‌رنگ بودند. همچنین، از نظر مورفولوژی سلول، کاملا متغیر می‌باشند. گونه‌های جنس *Cryptococcus* دارای پرگنه‌های کرمی رنگ و عمدتا محدب بودند و جوانه‌زنی سلول در آن‌ها از نوع تک‌قطبی بود. پرگنه‌های مربوط به جنس‌های *Rhodotorula* و *Rhodosporidium* نارنجی تا صورتی کم‌رنگ بودند و جوانه‌زنی سلول‌های آن‌ها دو قطبی می‌باشد (نتایج نشان داده نشده است). پس از این گروه‌بندی اولیه به منظور غربال‌گری از انگشت‌نگاری DNA (MSP-PCR) استفاده شد (شکل ۱) که در نهایت از مجموع ۱۸۴ جدایه مخمر جداسازی شده، ۷۹ جدایه برای توالی‌یابی ارسال گردید. براساس نتایج داده‌های توالی، تعداد ۵۸ جدایه معتلق به شاخه بازیدیومیکوتا می‌باشند. براساس نتایج توالی‌یابی مخمرهای بازیدیومیستی جداسازی شده از خاک‌های نمونه‌برداری شده، متعلق به شش جنس و ۲۵ گونه می‌باشند (جدول ۲).



شکل ۱- الگوی انگشت نگاری ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌های مخمر به دست آمده از خاک‌های مناطق مختلف ایران با استفاده از تکنیک MSP-PCR که در هشت گروه مجزا قابل مشاهده می‌باشد.

Fig. 1. Genomic DNA fingerprining of yeast isolates recovered from soil samples in different regions of Iran using MSP-PCR technique representing eight groups.

جدول ۲- لیست گونه‌های مخمر شناسایی شده در این تحقیق به همراه شماره دسترسی به توالی D1/D2 در بانک ژن

Table 2. List of yeast species identified in the present study and GenBank accession numbers for D1/D2 region

Species	Collected from	GenBank No.
Cryptococcus aerius	All cites except Ahvaz and Abadan	KP722594
Cryptococcus albidus	Ardebil, Tabriz, Meshkin Shahr, Rasht, Salmas, Khoy, Sanandaj, Piranshahr, Urmia, Karaj, Ahar, Makou	KP737834
Cryptococcus albidosimilis	Arasbaran forests	KP737854
Cryptococcus bhutanensis	Arasbaran forests	KP722595
Cryptococcus diffluens	Arasbaran forests	KP737835
Cryptococcus friedmannii	Sanandaj, Ardebil, Tabriz	KP737833
Cryptococcus flavescens	Arasbaran forests	KP737836
Cryptococcus oeirensis	Yazd, Isfahan	KP737837
Cryptococcus podzolicus	Mashhad	KP737838

Table 2 (contd) **جدول ۲ (ادامه)**

Crytococcus ramirezgomezianus	Arasbaran forests	KP737839
Cryptococcus saitoi	Tehran	KP737840
Cryptococcus terreus	Arasbaran forests	KP737841
Cryptococcus uzbekistansesis	Tabriz, Urmia, Meshkin Shahr, Gorgan, Rasht, Kermanshah, Ardebil, Salmas	KP737842
Cryptococcus victoriae	Karaj	KP737843
Cryptococcus watticus	Makou, Khoy	KP737844
Fibulobasidium inconspicuum	Ardestan	KP737845
Holtermanniella takashimae	Arasbaran forests	KP737846
Rhodosporidium babjevae	Arasbaran forests	KP737847
Rhodosporidium diobovatum	Isfahan, Ardestan, Najafabad	KP737855
Rhodosporidium kratochvilovae	Shiraz, Kazeron, Ardestan, Isfahan	KP737848
Rhodotorula laryngis	Arasbaran forests, Gorgan, Rasht	KP737849
Rhodotorula lysiniphila	Arasbaran forests, Ardebil, Ahar, Meshkin	KP737850
Rhodotorula minuta	Arasbaran forests, Gorgan, Rasht, Ardebil, Meshkin Shahr	KP737851
Rhodotorula mucilaginosa	Arasbaran forests, Gorgan, Rasht, Ardebil, Meshkin, Kerman, Kermanshah, Malekan, Miandoab	KP737852
Trichosporon pullulans	Arasbaran forests	KP737856

به طور کلی در این پژوهش، تعداد ۲۵ آرایه به عنوان آرایه‌های جدید برای مایکوبیوتای ایران گزارش می‌شوند. موقعیت هر یک از گونه‌ها در درخت فیلوژنتیک مشخص شده است. اغلب گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق براساس توالی D1/D2 از یکدیگر قابل تشخیص می‌باشند. تنها دو گونه *Cryptococcus saitoi* و *Cryptococcus friedmannii* براساس توالی این ناحیه از یکدیگر قابل تفکیک نمی‌باشند که در این مورد از داده‌های توالی ناحیه ITS-rDNA استفاده گردید (داده نشان داده نشده است).

در بخش زیر، شرح و توصیف جامعی از آرایه‌های شناسایی شده در این تحقیق براساس داده‌های مولکولی، برخی از خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی ارایه گردیده است. توصیف گونه‌ها به ترتیب حروف الفبا تنظیم یافته است:

۱- *Cryptococcus aerius* (Saito) Nannizzi (Pollacci & Nannizzi 1927)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت دو هفته در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، پرگنه‌ها سفید مایل به زرد یا صورتی با سطح براق یا صاف می‌باشند. ریسه کاذب مشاهده نمی‌شود.

گونه *C. aerius* در حال حاضر، متعلق به خوشه *aerius* و دودمان *Filobasidiales* و در ارتباط نزدیک با بقیه گونه‌های خاک‌زی است. *C. aerius* ممکن است از *C. albidus* و همچنین از سایر بستگان نزدیک خود در خوشه *aerius* توسط توالی D1/D2 و یا مقایسه توالی ITS قابل تفکیک باشد (Scorzetti *et al*. 2002)، ولی تفاوت آن از نظر فیزیولوژیکی با *C. albidus* شامل توانایی *C. aerius* در جذب methyl-ά-D-glucoside، mucate و gentisate و همچنین رشد در محیط بدون اضافه کردن ویتامین‌ها می‌باشد.

این گونه نخستین بار از نمونه‌های هوا و خاک در توکیو جداسازی شده است. در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۲۱/۱ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق تبریز، ارومیه، اردبیل، سنندج، مشهد، اصفهان، سلماس، خوی، مشکین شهر،

اهر، میاندوآب، پیرانشهر، یزد، کرمان، گرگان، تهران، کرج، جنگل‌های ارسباران، ماکو، رشت، کرمانشاه و ملکان شناسایی شد.

۲- *Cryptococcus albidus* (Saito) Nannizzi (Pollacci & Nannizzi 1927)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت دو هفته در دمای ۲۰ درجه سلسیوس دارای پرگنه‌های کرمی متمایل به صورتی، با سطح براق و صاف می‌باشند. تولید ریسه کاذب نمی‌کنند. این گونه متعلق به دودمان *Filobasidiales* و خوشه *albidus* می‌باشد.

این گونه تا مدت‌ها به عنوان یک گونه متغیر شناخته شده بود، ولی مطالعات اخیر نشان داده که در واقع یک گونه مرکب می‌باشد (Fonseca *et al*. 2000, Sugita *et al*. 2001).

نمونه تیپ گونه مذکور از هوا در توکیو ژاپن جداسازی شده است. *C. albidus* یک گونه فراگیر از نظر جغرافیایی (اروپا و آسیا، استرالیا) و نوع بستر جداسازی (بالینی، مواد غذایی، نمونه‌های گیاهی، خاک از کویر و یخ) می‌باشد (Vishniac 1995, 2006). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۱۱/۴ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق اردبیل، تبریز، مشکین شهر، رشت، سلماس، خوی، سنندج، پیرانشهر، ارومیه، کرج، اهر و ماکو شناسایی شد.

۳- *Cryptococcus albidosimilis* Vishniac & Kurtzman (1992)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت دو هفته در دمای ۲۰ درجه سلسیوس دارای پرگنه‌های به رنگ کرم، مخاطی با سطح صاف و براق می‌باشند. این گونه متعلق به دودمان *Filobasidiales* و خوشه *albidus* می‌باشد و از گونه *C. albidus* براساس توانایی در جذب methyl-ά-D-glucoside و ethylamine توسط *C. albidosimili* تفکیک می‌شوند.

این گونه نخستین بار از خاک‌های جنوب ویکتوریا گزارش شده است. این گونه علاوه بر خاک از مواد مورد استفاده در تهیه مالت در مراحل اولیه مالت‌سازی در هلند گزارش شده است (Laitila *et al*. 2006). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۳/۱ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از جنگل‌های ارسباران شناسایی شد.

۴- *Cryptococcus bhutanensis* Goto & Sugiyama (1970)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت دو هفته در دمای ۲۰ درجه سلسیوس دارای پرگنه‌های با رنگ کرم رنگ پریده، نرم تا مخاطی متوسط با سطح براق و صاف می‌باشند. متعلق به دودمان *Filobasidiales* و خوشه *albidus* می‌باشد. این گونه از نظر فیزیولوژیکی و داده‌های توالی ناحیه D1/D2 مشابه *C. antarcticus* می‌باشد، به طوری که در توالی D1/D2 دارای شش نوکلئوتید و در توالی ناحیه ITS-rDNA دارای هفت نوکلئوتید اختلاف هستند (Sampaio *et al*. 2004). تمایز آن‌ها براساس رشد و جذب raffinose، L-rhamnose و D-gluconate می‌باشد. به این ترتیب که این گونه قادر به رشد و جذب L-rhamnose، rhamnose و D-gluconate، ولی گونه *C. antarcticus* قادر به رشد و جذب روی آن‌ها نمی‌باشد.

این گونه نخستین بار از نمونه‌های خاک در کشور بوتان جداسازی و گزارش شده است و به نظر می‌رسد پراکنش این گونه به خاک محدود شود. در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۳/۷ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از جنگل‌های ارسباران شناسایی شد.

۵- *Cryptococcus diffluens* Lodder, J. & N.J.W. Kreger-van Rij. 1952

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت دو هفته در دمای ۲۰ درجه سلسیوس دارای پرگنه‌های کرمی، مخاطی، با سطح صاف و براق دارای بافت فوق‌العاده چسبناک است. این گونه متعلق به دودمان *Filobasidiales* و خوشه *albidus* می‌باشد. این گونه از نظر فیلوژنتیکی به گونه *C. albidus* نزدیک است. مشخصات فیزیولوژیکی *C. diffluens* با مشخصات فیزیولوژیکی *C. albidus* مشابه است. اما گونه *C. diffluens* قادر به جذب ethylamine و methyl-ά-D-glucoside نمی‌باشد.

نخستین بار این گونه، از ناخن یک بیمار ۴۸ ساله در اتریش جداسازی و گزارش شده است. همانند *C. albidus* از منابع مختلف نظیر سطح گیاهان، خاک، سواحل دریایی، صحرا و دستگاه گوارش سوسک جداسازی شده است Fonseca & Inácio (2006, Vishniac 2006). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۲/۹ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از جنگل‌های ارسباران شناسایی شد.

۶- *Cryptococcus friedmannii* Vishniac (1985)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت دو هفته در ۱۸ درجه سلسیوس دارای پرگنه‌های کرم تا نارنجی با سطح کدر و صاف می‌باشد. متعلق به دودمان *Filobasidiales* و خوشه *albidus* می‌باشد. براساس توالی ناحیه D1/D2، *C. friedmannii* از گونه *C. saitoi* قابل تفکیک نیست. تفکیک

این دو گونه از یکدیگر براساس توالی ناحیه ITS-rDNA امکان‌پذیر است (داده‌ها نشان داده نشده است).

این گونه نخستین بار از نمونه‌های جمع‌آوری شده قطب جنوب براساس خصوصیات فیزیولوژیکی شناسایی شد (Vishniac 1985). این گونه از خاک‌های نواحی مختلف شامل آلاسکا، روسیه، آمریکا و کشورهای مختلف جداسازی و گزارش شده است (Faizutdinova *et al*. 2005). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۳/۶ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق سنندج، اردبیل و تبریز شناسایی شد.

۷- *Cryptococcus flavescens* (Saito) C.E. Skinner (1950)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت دو هفته در ۱۸ درجه سلسیوس دارای پرگنه‌های تخت تا حدودی محدب، کدر، مایل به خاکستری-کرم، با سطح صاف و حاشیه موج‌دار می‌باشد. سلول‌ها با شکل نامنظم استوانه‌ای، بیضوی و گلابی شکل و اغلب تا حدی متورم می‌باشند. جوانه‌زنی قطبی و جانبی می‌باشد و سلول‌ها ممکن است تشکیل ریسه‌های کاذب کوتاهی را دهند. متعلق به دودمان *Tremellales* و خوشه *Bulleromyces* می‌باشد. *C. flavescens* از نظر ویژگی‌های فیزیولوژیکی مشابه *C. laurentii* و همچنین بقیه اعضای خوشه *Bulleromyces* می‌باشد (Golubev *et al*. 2004). تفاوت آن با گونه *C. laurentii* شامل عدم توانایی آن در جذب دی-گلوکوزامین و کراتینین و همچنین توانایی رشد *C. flavescens* در محیط بدون اضافه کردن ویتامین می‌باشد.

این گونه نخستین بار از نمونه‌های هوا در ژاپن و بعد از آن از گیاهان گرمسیری در اندونزی گزارش شده است. این گونه دارای اکولوژی متغیری می‌باشد و از هوا، دانه گندم، ذرت پس از برداشت (Kurtzman 1973)، سس سویا تخمیر شده و مایع مغزی نخاعی از بیمار مبتلا به ایدز از کشورهای ژاپن، ایالات متحده آمریکا، اندونزی و اروپا جداسازی و گزارش شده است (Golonka 2002). *C. flavescens* به عنوان عامل کنترل بیولوژیک در سوختگی فوزاریومی سنبله گندم (FHB) در غلات، حبوبات، بویژه جو و گندم شناخته شده است (Dunlap *et al*. 2007).

در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۰/۷ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از جنگل‌های ارسباران شناسایی شد.

۸- *Cryptococcus oeirensis* A. Fonseca, Scorzetti & Fell (2000)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت دو هفته در ۲۵ درجه سلسیوس دارای پرگنه‌های شفاف متمایل به صورتی-کرم، نرم متمایل به مخاطی، براق و با سطحی صاف می‌باشد. براساس آنالیز توالی D1/D2، این گونه متعلق به خوشه floriforme و دودمان *Filobasidiales* می‌باشد. *C. oeirensis* و *C. magnus* در توالی D1/D2 فقط در دو نوکلئوتید با هم تفاوت دارند (Scorzetti *et al*. 2002) و وجه تمایز آن‌ها در جذب L-tartrate توسط *C. magnus* می‌باشد. *C. oeirensis* از *C. albidus* به وسیله توانایی آن در استفاده از گالاکتوز، galactitol و ethylamine قابل تفکیک می‌باشد.

این گونه نخستین بار از برگ‌های یک گونه گیاهی ناشناخته آلوده به بیماری زنگ در پرتغال جداسازی و گزارش شده است. همچنین، از سبزی‌های یخزده و شهد گل نیز گزارش شده است (Butinar *et al*. 2007). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۲/۹ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق یزد و اصفهان شناسایی شد.

۹- *Cryptococcus podzolicus* (Bab'eva & Reshetova) W. Golubev (1981)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت دو هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس دارای پرگنه‌های صاف و تا حدودی برجسته، براق، زرد رنگ‌پریده مایل به خاکستری، قهوه‌ای مایل به کرم، داری حاشیه صاف و تا حدودی موج‌دار می‌باشد. سلول‌ها بیضوی تا استوانه‌ای کشیده، دارای جوانه‌زنی قطبی می‌باشند. این گونه متعلق به دودمان *Tremellales* می‌باشد. اعضای گونه *Cryptococcus podzolicus* به راحتی براساس شکل کشیده سلول (fusoidal) از سایر گونه‌های *Cryptococcus* قابل شناسایی هستند. اعضای این گونه به دلیل تشابه در تست‌های فیزیولوژیکی مانند رشد در L-sorbose و ribitol از گونه *Cryptococcus laurentii* قابل تمایز نیستند و تنها وجه تمایز این دو گونه شکل سلول می‌باشد.

این گونه از خاک‌های نواحی مختلف بویژه خاک‌های جنگلی گزارش شده است و در هلند از چوب‌های در حال پوسیدن جداسازی و گزارش شده است (Middelhoven 2004, Maksimova & Chernov 2004). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۳/۷ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از منطقه مشهد شناسایی شد.

۱۰- *Crytococcus ramirezgomezianus* M. Takashima, Sugita, Shinoda & Nakase (2001)

در محیط کشت مالت آگار پرگنه‌های این گونه بعد از گذشت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، به رنگ زرد دیده می‌شود. پرگنه‌ها درخشان تا کدر، صاف تا چین‌دار می‌باشند. قادر به جذب لاکتوز، تری‌هالوز، مالتوز، سلوبیوز و دی- زایلوز می‌باشد. همچنین، پاسخ به آنزیم اوره‌آز در این گونه مثبت می‌باشد. در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۱/۳ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از جنگل‌های ارسباران شناسایی شد. این گونه متعلق به دودمان *Trichosporonales* و خوشه *humicola* می‌باشد (Takashima *et al*. 2001).

این گونه براساس داده‌های ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک قبلا در کمپلکس *C. humicola* طبقه‌بندی می‌گردید. تاکاشیما و همکاران (۲۰۰۱) براساس داده‌های توالی این گونه را به عنوان گونه مستقل توصیف نمودند. *C. humicola* از منابع نیتروژن قادر به جذب نیتریت سدیم می‌باشد، در حالی که *C. ramirezgomezianus* قادر به جذب آن نمی‌باشد. همچنین، از منابع کربن *C. humicola* قادر به جذب و استفاده از اتانول و Hexadecane می‌باشد درحالی‌که *C. ramirezgomezianus* قادر به استفاده از این مواد نمی‌باشد.

۱۱- *Cryptococcus saitoi* A. Fonseca, Scorzetti & Fell (2000)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت دو هفته در دمای ۲۰ درجه سلسیوس دارای پرگنه‌های با رنگ زرد متمایل به کرم، با سطح کدر و صاف می‌باشد. این گونه متعلق به دودمان *Filobasidiales* و خوشه *albidus* می‌باشد و براساس آنالیز توالی D1/D2، این گونه از گونه *C. friedmannii* قابل تفکیک نیست (شکل ۲). با توجه به مطالعات فیلوجغرافیایی DNA به نظر می‌رسد *C. saitoi*، یک گونه فراگیر از نظر جغرافیایی (اروپا، آسیا، قطب جنوب) و نوع بستره (بالینی، مواد غذایی، گیاه و خاک) باشد. این گونه از نظر فیزیولوژیکی مشابه *C. albidus* و *C. diffluens* می‌باشد، ولی *C. saitoi* قادر به جذب methyl-ά-D-glucoside می‌باشد.

این گونه نخستین بار از خاک‌های نواحی ویکتوریا جداسازی و گزارش شده است. در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۲/۶ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از منطقه تهران شناسایی شد.

۱۲- *Cryptococcus terreus* di Menna (1954)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت دو هفته در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، پرگنه‌ها به رنگ کرم و کمی مخاطی و با سطح براق و صاف می‌باشد. این گونه متعلق به دودمان *Filobasidiales* و خوشه *aerius* می‌باشد. گونه *Cryptococcus terreus* تشابه زیادی به گونه *C. phenolicus* دارد و وجه تمایز این دو گونه از یکدیگر براساس توانایی این گونه در تجزیه فنول می‌باشد (Ikeda *et al.* 2000). از نظر فیلوژنتیکی به طور نسبی نزدیک به گونه *C. aerius* می‌باشد، اما *C. terreus* در مناطق با پوشش گیاهی غنی حضور دارد و دارای توزیع جغرافیایی وسیعتری می‌باشد (Bergauer *et al*. 2005, Hong *et al*. 2002, 2006).

این گونه نخستین بار از خاک باغ در نیوزیلند گزارش شده است (Ikeda *et al*. 2000). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۱/۹ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از جنگل-های ارسباران شناسایی شد.

۱۳- *Cryptococcus uzbekistanensis* A. Fonseca, Scorzetti & Fell (2000)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت دو هفته در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، پرگنه‌ها سفید متمایل به صورتی و دارای سطح صاف و کمی براق هستند. این گونه براساس آنالیز توالی D1/D2 و ITS، متعلق به خوشه *albidus* و دودمان *Filobasidiales* می‌باشد (Fonseca *et al.* 2000, Scorzetti *et al*. 2002). *C. uzbekistanensis* از نظر فیزیولوژیکی مشابه اعضای خوشه *albidus* می‌باشد. تفاوت عمده با *C. albidus* در توانایی جذب methyl-ά-D-glucoside و تفاوت مهم آن با *C. diffluens* در توانایی جذب L-tartrate می‌باشد.

این گونه نخستین بار از خاک‌های کویری جداسازی و گزارش شده است. در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۸/۱ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق تبریز، ارومیه، سلماس، مشکین شهر، گرگان، رشت، کرمانشاه و اردبیل شناسایی شد.

۱۴- *ryptococcus victoriae* M.J. Montes, Belloch, Galiana, M.D. Garcı´a, C. Andre´s, S. Ferrer, Torres-Rodriguez & J. Guinea (1999)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت هفت روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، پرگنه‌ها حالت تخت، براق به رنگ زرد قهوه‌ای و دارای حاشیه صاف و کامل می‌باشند. سلول‌ها بیضوی یا لیمویی شکل و به حالت کشیده، جوانه‌زنی سیمپودیال و سلول‌ها ممکن است تشکیل زنجیره کوتاهی را بدهند. در

مواردی ممکن است ریسه کاذب کوتاه دیده شود. گونه مذکور متعلق به دودمان *Tremellales* و خوشه *victoriae* می‌باشد. این گونه نیز مانند غالب گونه‌های *Cryptococcus* قادر به تخمیر گلوکز نمی‌باشد.

این گونه نخستین بار از خاک جداسازی و معرفی شده است ولی در هلند از گل‌ها (Herzberg *et al.* 2002) و همچنین از سطح میوه سیب (Gildemacher *et al.* 2004, 2006) جداسازی و گزارش شده است. در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۰/۹ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از منطقه کرج شناسایی شد.

۱۵- *Cryptococcus watticus* Guffogg, Thomas-Hall, Holloway & Watson (2004)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت دو هفته در ۱۵ درجه سلسیوس، پرگنه‌ها صورتی، گرد با حاشیه کامل می‌باشند. پرگنه‌ها چسبناک و پایدار می‌باشند. این گونه براساس آنالیز توالی D1/D2، یکی از اعضای خوشه *Holtermannia* می‌باشد و براساس توانایی رشد رشد در محیط نیترات‌دار و عدم رشد در محیط حاوی مالتوز از دیگر گونه‌های *Cryptococcus* قابل تشخیص می‌باشد.

این گونه نخستین بار از خاک‌های قطب جنوب جداسازی شده است و بهترین رشد را در دمای ۱۵ درجه دارد (Guffogg *et al.* 2004). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۱/۸ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق ماکو و خوی شناسایی شد.

۱۶- *Fibulobasidium inconspicuum* Bandoni (1979)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت یک ماه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، پرگنه خاکستری مایل به قهوه‌ای-زرد، خمیری، تا حدی چروکیده متمایل به صاف است با لبه مرکب از چند قطعه می‌باشد. پس از سه روز در ۲۵ درجه سلسیوس، سلول‌ها نیمه‌کروی و متمایل به گرد هستند. ریسه یا ریسه کاذبی در این گونه مشاهده نمی‌شود. براساس داده‌های توالی ناحیه D1/D2، این گونه در داخل دودمان *Tremellales* قرار می‌گیرد.

گونه مذکور، نخستین بار از شاخه‌های رو به باد بلوط در جنوب آمریکا جداسازی و گزارش شده است. در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۰/۸ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از منطقه اردستان شناسایی شد.

۱۷- *Holtermanniella takashimae* Wuczkowski, Passoth, Andersson, Turchetti, Prillinger, Boekhout & Libkind (2010)

پرگنه‌ها به رنگ کرم تا زرد روشن می‌باشند و تولید ریسه یا ریسه کاذب نمی‌کنند، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس رشد ضعیفی دارند، به آزمون اوره پاسخ مثبت می‌دهد، ولی قادر به تخمیر نبوده و فقط قادر به جذب myo-Inositol و D-glucuronate می‌باشد. این گونه در خوشه *Holtermannia* و دودمان *Tremellomycetes* قرار می‌گیرد.

این گونه از پسماندهای کشاورزی در اتریش (Wuczkowski *et al.* 2003) و نمونه‌های جو در آرژانتین جداسازی و گزارش شده است (Libkind *et al.* 2009). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۱/۳ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از جنگل‌های ارسباران شناسایی شد.

۱۸- *Rhodosporidium babjevae* Golubev (1993)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت شش روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، سلول‌ها نیمه‌کروی، متمایل به گرد هستند. در برخی از موارد زنجیره کوتاه از سلول‌ها تشکیل می‌شود. ریسه کاذب تشکیل نمی‌شود. این گونه به همراه گونه *R. graminis* متعلق به *R. glutinis* می‌باشد (Gadanho & Sampaio 2002).

این گونه همه‌جازی محسوب می‌شود و تاکنون از اروپا (روسیه، پرتغال، انگلستان و آلمان) و آمریکا (ایالات متحده آمریکا و آرژانتین) و آسیا (ژاپن) روی بسترهای مختلف مانند فیلوسفرگیاهان، گل، میوه، دانه، پوست درخت، خاک، هوا، آب شیرین و آب دریا گزارش شده است (Gadanho *et al.* 2003). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۱/۳ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از جنگل‌های ارسباران شناسایی شد.

۱۹- *Rhodosporidium diobovatum* Newell & I.L. Hunter 1970)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت شش روز در دمای۲۰ درجه سلسیوس، پرگنه‌ها قرمز، مخاطی، صاف، براق و دارای حاشیه کامل می‌باشد. سلول‌ها کروی متمایل به بیضوی می‌باشند. جوانه‌زنی عمدتا قطبی است. *R. diobovatum* متعلق به کمپلکس گونه *R. glutinis* می‌باشد دو گونه *R. babjevae* و *R. graminis* نیز به مربوط به این کمپلکس می‌باشند. از بین اعضای این گروه *R. diobovatum* تنها گونه‌ای است که قادر به استفاده از اسید گالیک می‌باشد. برای تفکیک این گونه‌ها از داده‌های مولکولی استفاده می‌شود.

این گونه نخستین بار از خاک در ایتالیا جداسازی و گزارش شده است و در تنوع گسترده‌ای از زیستگاه‌های آبی، از جمله صخره‌های مرجانی در فلوریدا و زیستگاه‌های خشکی بویژه از گیاهان و خاک جداسازی گردیده است (Gadanho & Sampaio 2005). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۳/۴ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق اصفهان، اردستان و نجف‌آباد شناسایی شد.

۲۰- *Rhodosporidium kratochvilovae* Hamamoto, Sugiyama & Komagata (1988)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت شش روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، پرگنه‌ها به رنگ نارنجی، نیمه‌براق و دارای حاشیه کامل می‌باشند. سلول‌ها عمدتا به اشکال تخم‌مرغی، گاهی کروی یا استوانه‌ای دیده می‌شوند. جوانه‌زنی عمدتا قطبی می‌باشد. این گونه متعلق به راسته *Sporodiales* می‌باشد. نزدیک‌ترین گونه به *R. kratochvilovae*، گونه *R. araucariae* می‌باشد که وجه تمایز آن‌ها نتیجه مثبت *R. kratochvilovae* به آزمون L-arabinose، maltose و melezitose در مقابل نتیجه منفی گونه *R. araucariae* به این آزمون‌ها می‌باشد.

این گونه نخستین بار از سطح گیاهان در پرتغال جداسازی و گزارش شده است. *R. kratochvilovae* را می توان از زیستگاه‌های مختلف جداسازی کرد. جدایه‌های این گونه اغلب از محیط‌های خشکی، به خصوص منابع مرتبط با گیاه جدا شده‌اند (Sampaio *et al.* 2002). این امکان وجود دارد که جدایه‌های به دست آمده از منابع آبی (آب شیرین و آب دریا) اساسا منشأ زمینی داشته باشند و توسط روان‌آب، آب باران، باد و یا مکانیسم‌های دیگر به زیستگاه آبزیان منتقل شده باشند (Sampaio *et al.* 2004). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۳/۶ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق شیراز، کازرون، اردستان و اصفهان شناسایی شد.

۲۱- *Rhodotorula laryngis* Reierso (1955)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت شش روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، پرگنه‌ها صورتی درخشان، تا حدی مخاطی، صاف با حاشیه کامل می‌باشد. سلول‌ها بیضوی تا کشیده می‌باشند. جوانه‌زنی عمدتا قطبی دارند. این گونه متعلق به راسته *Cystobasidiales* و رده *Cystobasidiomycetes* می‌باشد.

این گونه نخستین بار از آب دریا در سوئد جداسازی و گزارش شده است. در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۲/۳ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق گرگان، رشت و جنگل‌های ارسباران شناسایی شد.

۲۲- *Rhodotorula lysiniphila* Nagahama Hamamoto, Nakase & Horikoshi (2003)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت شش روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس پرگنه‌ها به رنگ نارنجی روشن، درخشان، صاف و با حاشیه کامل می‌باشد. سلول‌ها بیضوی تا کشیده می‌باشند. جوانه‌زنی عمدتا قطبی دارند. این گونه متعلق به راسته *Cystobasidiales* از رده *Cystobasidiomycetes* می‌باشد. ویژگی متمایز کننده *Rh. Lysiniphila*، استفاده از L-lysine به عنوان منبع نیتروژن می‌باشد.

این گونه نخستین بار از یخچال‌های طبیعی در کشور اتریش جداسازی و گزارش شده است. تاکنون از کشورهای نروژ، اتریش و ژاپن گزارش شده است. در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۴/۲ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق اردبیل، اهر، مشکین شهر و جنگل‌های ارسباران شناسایی شد.

۲۳- *Rhodotorula minuta* (Saito) F.C. Harrison (1928)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت شش روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس پرگنه‌ها صورتی، درخشان و لیز، دارای حاشیه لیز و کامل می‌باشد. سلول‌ها بیضوی، جوانه‌زدن به صورت قطبی، ریسه و ریسه کاذب دیده نمی‌شود. این گونه متعلق به راسته *Cystobasidiales* و رده *Cystobasidiomycetes* می‌باشد. نزدیک‌ترین گونه‌ها به این گونه، *R. slooffiae* و *Cystobasidium fimetarium* می‌باشند. این سه گونه از نظر فیزیولوژیکی و فنوتیپی غیرقابل تشخیص می‌باشند و فقط با ابزار مولکولی تفکیک‌پذیرند (Libkind *et al*. 2003)

این گونه از نمونه‌های هوا در ژاپن و خرچنگ در مکزیک جداسازی شده است. دارای پراکنش جغرافیایی گسترده می‌باشد و از آب دریا (در اعماق دریا و آب‌های شیرین) و خاک جداسازی شده است (Libkind *et al*. 2003). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۴/۸ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق گرگان، رشت، اردبیل، مشکین شهر و جنگل‌های ارسباران شناسایی شد.

۲۴- *Rhodotorula mucilaginosa* (Jorgensen) F.C. Harrison (1928)

در محیط کشت مالت آگار بعد از گذشت شش روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس پرگنه‌ها صورتی، متغیر از نارنجی زعفرانی به مرجانی می‌باشند. پرگنه‌ها درخشان (گاهی اوقات کدر)، مخاطی، به طور معمول صاف و حاشیه کامل است، سلول‌ها نیمه‌کروی متمایل به بیضوی یا تخم‌مرغی شکل هستند. جوانه‌زدن عمدتا قطبی می‌باشد. این گونه متعلق به راسته *Sporidiobolales* از *Microbotryomycetes* می‌باشد. مهم‌ترین آزمون فیزیولوژیکی که به شناسایی این گونه از سایر گونه‌های نزدیک کمک می‌کند، نتیجه مثبت آزمون نیترات است که سبب تمایز این گونه از گونه‌های *Rhodotorula dairenensis*، *R. babjevae*، *R. dairenensis*، *R. colostri* و *R. minuta* می‌شود.

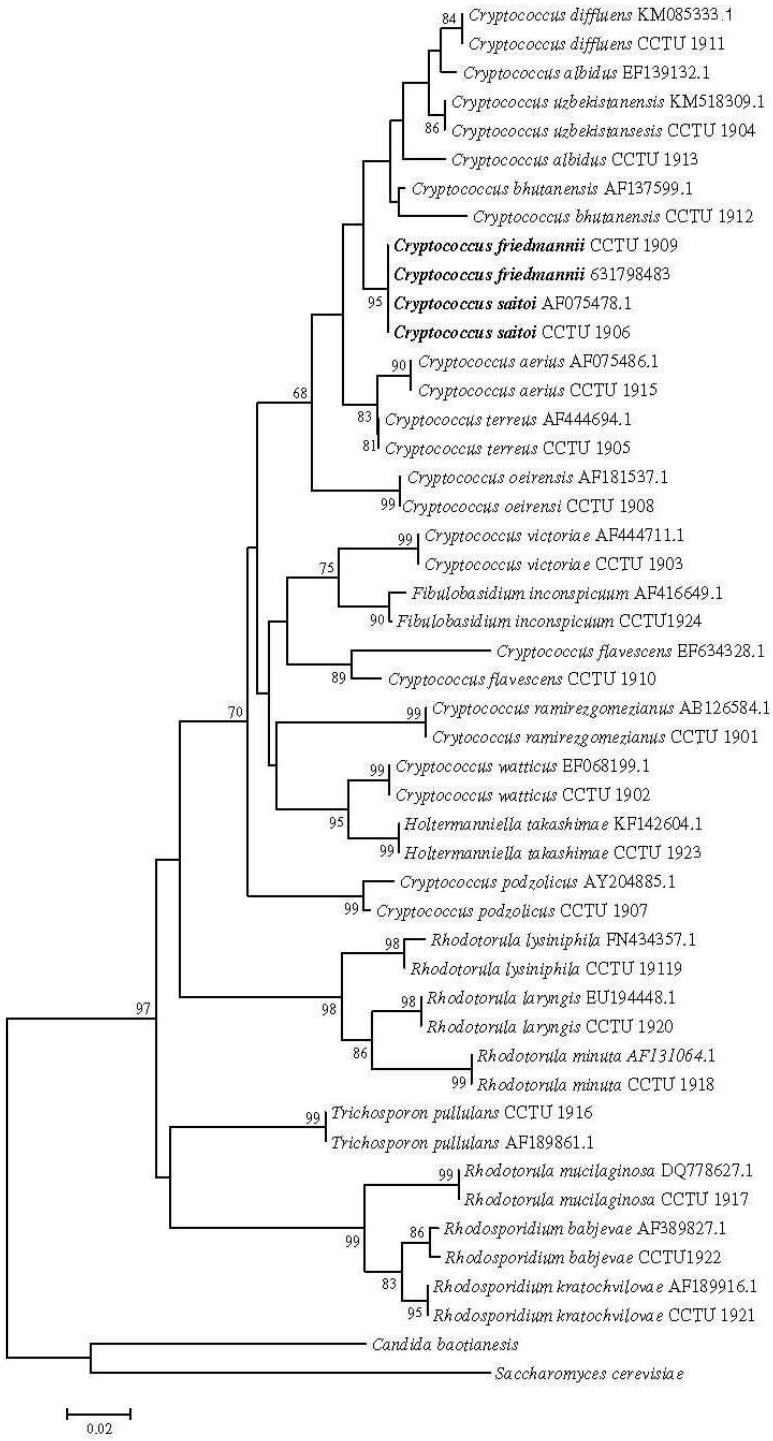
این گونه نخستین بار از نمونه‌های هوا از ژاپن گزارش شده است. در سرتاسر جهان از طیف توزیع گسترده‌ای برخوردار است و از زیستگاه‌ها و بسترهای آبی (آب شیرین و دریایی)، خاک، میوه، سطح گیاهان، حاشیه دریا، موی انسان، پوست حیوانات، تنباکو و آب‌جو جداسازی شده است. در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۷/۱ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق گرگان، رشت، اردبیل، مشکین شهر، کرمان، کرمانشاه، ملکان، میاندوآب و جنگل‌های ارسباران شناسایی شد.

۲۵- *Trichosporon pullulans* Diddens & Lodder (1942)

در محیط کشت مالت آگار پس از سه روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، سلول‌ها به اشکال استوانه‌ای، بیضوی و به ندرت گرد دیده می‌شود. پرگنه‌ها به حالت کدر و یا مرطوب، صاف یا خشن، با حاشیه کامل یا ناقص دیده می‌شود. این گونه قادر به استفاده از نیترات به عنوان منبع نیتروژن می‌باشد. این گونه اغلب از خاک گزارش شده است (Romer *et al*. 2002). در تحقیق حاضر، این گونه با فراوانی ۱/۳ درصد از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از جنگل‌های ارسباران شناسایی شد.

براساس نتایج این تحقیق، غالب گونه‌های جداسازی شده از خاک متعلق به دو جنس *Cryptococcus* و *Rhodotorula* بوده و بیش از ۵۰ درصد جدایه‌های این تحقیق متعلق به جنس *Cryptococcus* می‌باشد. این جنس در مطالعات متعدد دیگری نیز به عنوان گونه غالب خاک معرفی شده است (Libkind *et al*. 2003, 2009, de Garc´ıa *et al*. 2007, Russo *et al*. 2008). فراوانی بالای گونه‌های این جنس در خاک را می‌توان به وجود کپسول پلی‌ساکاریدی نسبت داد که آن‌ها را در برابر تنش‌ها و شرایط نامطلوب محیطی محافظت می‌کند (Slavikova & Vadkertiova 2000). براساس آخرین گزارش کورتزمن و همکاران (Kurtzman *et al*. 2011) اعضای جنس *Cryptococcus* پلی‌فیلتیک بوده و در چهار راسته *Tremellales*، *Trichosporonales*، *Filobasidiales* و *Cystofilobasidiales* طبقه‌بندی می‌شوند. گونه‌های *Cryptococcus* جداسازی شده از خاک‌های ایران متعلق به سه راسته *Tremellales* و *Filobasidiales* و *Trichosporonales* می‌باشند.

گونه‌های جنس *Cryptococcus*، عموما براساس توالی ناحیه D1/D2 از یکدیگر قابل تفکیک می‌باشند (شکل ۲). با این وجود در مورد برخی گونه‌ها مانند *Cryptococcus friedmannii* و *Cryptococcus saitoi* توالی ناحیه D1/D2 از کارآیی لازم برای شناسایی برخوردار نمی‌باشد و برای شناسایی دقیق گونه توالی دیگر نواحی ژنی مورد نیاز می‌باشد. در این تحقیق برای شناسایی دقیق این دو گونه از توالی‌یابی ناحیه ITS استفاده شد.



شکل ۲- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از روش نزدیکترین پیوست‌همسایه براساس توالی ناحیه D1/D2 زیرواحد بزرگ DNA ریبوزومی. ارزش عددی بوت استرپ بالای ۶۰ در محل گره‌ها نمایش داده شده است. گونه *Saccharomyces servazzii* (شماره دسترسی U68558) به عنوان گروه خارجی انتخاب شد. مقیاس نشان‌دهنده ۰/۰۲ جایگزینی به ازای هر سایت می‌باشد.

* CCTU کد کلکسیونی دانشگاه تبریز

Fig. 2. A neighbour joining phylogenetic tree obtained from the D1/D2 sequence data. Bootstrap support values (>60) from 1000 replicates are indicated on the nodes. The tree was rooted to *Saccharomyces servazzii* (GenBank accession No: U68558). The scale bar indicates 0.02 substitutions per site.

* CCTU Collection code of Tabriz University

Cryptococcus aerius گونه‌ای است که از تمام نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف (با فراوانی ۲۱/۱ درصد)، به غیر از نمونه خاک آبادان و اهواز، جداسازی گردید و می‌توان گفت که گونه بومی و غالب خاک‌های ایران می‌باشد. از نمونه‌های خاک اهواز و آبادان هیچ‌گونه مخمری متعلق به شاخه بازیدیومیست‌ها جداسازی نگردید.

قابلیت مخمرها و قارچ‌ها در کلنیزه کردن آشیان‌های اکولوژیک غیرمعمول اخیرا توسط کانترل و همکاران در سال ۲۰۱۱ مورد بررسی قرار گرفته است (Cantrell *et al*. 2011). به طور کلی، مخمرهای بازیدیومیستی دامنه غذایی متنوع‌تری دارند و تحمل بیشتری به شرایط فرانرمال زیست محیطی نسبت به مخمرهای آسکومیستی دارند (Sampaio 2004). به علاوه، مخمرهای بازیدیومیستی اغلب در ارتباط با فیلوسفر گیاهان می‌باشند. به این دلیل احتمال جداسازی آن‌ها در نمونه‌برداری‌هایی که از خاک‌های سطحی صورت می‌گیرد بیشتر می‌باشد (Fonseca & In´acio 2006).

در بین خاک‌های نمونه‌برداری شده در این تحقیق، خاک جنگل‌های ارسباران بیشترین تنوع جمعیتی مخمر را دارا می‌باشند و همان طوری که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، برخی از گونه‌ها فقط از این منطقه جداسازی شده‌اند. به عنوان مثال گونه *Crytococcus ramirezgomezianus* تنها عضو دودمان *Trichosporonales* جداسازی شده در این تحقیق می‌باشد که از جنگل‌های ارسباران گزارش می‌شود. به طور کلی، عوامل محیطی، تعیین کننده توزیع و حضور میکروارگانیسم‌ها در محیط زیست می‌باشد. می‌توان گفت یکی از عوامل شناخته شده مؤثر بر جمعیت مخمر و تنوع زیستی، در دسترس بودن و غلظت مواد آلی می‌باشد (Deák 2006). بوتینار و همکاران در سال ۲۰۰۵ گونه‌های *Pichia guilliermondii*، *Debaryomyces hansenii*، *Yarrowia lipolytica*، *R. laryngis*، *R. babjevae* و *Candida parapsilosis* را از خاک‌های شور دنیا گزارش کردند که در این بررسی *R. laryngis* علاوه بر جنگل‌های ارسباران، از خاک‌های گرگان و رشت نیز جداسازی شده است. سلبمن و همکاران (Selbmann *et al*. 2014)، ۲۲ گونه مخمر را از صخره‌ها در نقاط مختلف دنیا جداسازی و گزارش کردند که از این تعداد، ۷۷ درصد مربوط به گونه‌های جنس *Crytococcus* می‌باشد.

برای حصول اطمینان از نتایج توالی‌یابی و تایید هویت گونه‌های مخمر، انجام تست‌های اولیه فیزیولوژیکی و مقایسه با منابع مرجع ضروری می‌باشد. در این بررسی، نتایج توالی‌یابی و تست‌های بیوشیمیایی کاملا برهم منطبق بودند. نتایج تست‌های فیزیولوژیکی در جدول ۳ ارایه شده است. توانایی جدایه‌های مورد مطالعه در جذب منابع مختلف کربن و نیتروژن می‌تواند مرتبط با اکولوژی آن‌ها باشد. گونه‌هایی با توزیع بیشتر، دارای الگوی جذبی گسترده‌تری هستند و گونه‌هایی با پراکنش کمتر گرایش به الیگوتروفی کمتری دارند (جدول ۳). با این وجود برخی از مخمرهایی که دارای خصوصیات مشابه فیزیویوژیکی هستند جایگاه مشابهی را در درخت فیلوژنی اشغال نمی‌کنند. در بررسی اولیه به نظر می‌رسد که بین داده‌های فیزیولوژیک و فیلوژنی هم‌خوانی وجود ندارد. به طور مثال، گونه‌هایی که از نیترات به عنوان تنها منبع جذب نیتروژن استفاده می‌کنند در درخت فیلوژنتیکی مخمرهای آسکومیستی پراکنده شده‌اند یا مثلا گونه‌هایی که قادر به تخمیر گلوکز هستند در داخل درخت فیلوژنتیکی پراکنده هستند، اما برعکس باکتری‌های مشابه از نظر خصوصیات فیزیولوژیکی، اغلب ارتباط فیلوژنتیکی بسیار نزدیکی نیز با هم دارند. مثلا باکتری‌هایی که تولید اسید استیک از اتانول می‌کنند دارای موقعیت فیلوژنتیکی کاملا مشابهی هستند، اما این مسئله در مورد مخمرها مصداق پیدا نمی‌کند (Wouter & Kurtzman 2003).

جدول ۳- نتایج بررسی جدایه‌های مخمر براساس خصوصیات فیزیولوژیکی و ویژگی‌های رشدی آن‌ها در تحقیق حاضر

Table 3. Characterisation of yeast isolates based on asssimilation profiles and growth tests in the present study

Species	Characteristic													
	Carbon assimilation					Nitrogen assimilation				Growth with			Additional tests	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Cryptococcus aerius	+	+	+	v	+	+	+	+	+	-	+	+	-/w	+
C. albidus	+	+	+	v	+	+	nd	v	+	-	-	+	+	+
C. albidosimilis	+	+	+	-/s	+	+	nd	v	+	-	-	+	+	+
C. bhutanensis	+	+	+	+	+	+	nd	+	+	-	-	+	+	+
C. diffluens	+	+	+	v	+	+	+	v	+	-	-	+	+	+
C. friedmannii	+	+	+	-	+	+	nd	+	+	-	s	+	+	+
C. flavescens	+	+	+	v	+	-	-	nd	nd	nd	+	+	+	+
C. oeirensis	+	+	+	v	+	+	+	-/w	+	-	-	+	+	+
C. podzolicus	+	+	+	+	+	-	+	+	+	v	-	+	+	+
C. ramirezgomezianus	+	+	-	-	-	-	-	v	v	-	-	+	+	+
C. saitoi	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
C. terreus	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C. uzbekistansesis	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	-	w	+
C. victoriae	+	+/s	+/s	+/s	+	-	nd	-	+	nd	v	+	+/w	+
Holtermanniella takashimae	+	-	+	+	+	+	nd	+	+	-	+	+	+	nd
Rhodosporidium diobovatum	+	+	v	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	-	nd
R. kratochvilovae	+	+	+/s	+	+	+	nd	+	+	-	+	+	-	nd
Rhodotorula lysiniphila	+	w	w	w	w	-	nd	+	+	-	-	+	+	nd
R. mucilaginosa	+	+	+	+	+/s	-	nd	+	+	v	-	+	-	nd
R. minuta	+	+	+	+	+	-	nd	+	+	-	-	+	-	nd
Trichosporon pullulans	+	+	+	v	+	+	-	+	+		+	+	+	nd

1: D-glucose, 2: D-xylose, 3: L-arabinose, 4: D-arabinose, 5: cellobiosis, 6: nitrate, 7: D-glucosamine c HCL, 8: L-lysine, 9: cadaverine, 10: 1% Cycloheximide, 11: Vitamin-free medium, 12: DBB reaction, 13: Starch production, 14: Urea hydrolyse. +, Growth; 2, no growth; w, weak growth; ND, not determined; v: variable; s: positive but slow

همه جدایه‌های مخمر بررسی شده در این تحقیق، در دماهای آزمایش شده یعنی ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۴۰ درجه سلسیوس قادر به رشد بودند. البته تعدادی از این جدایه‌ها مانند *C. albidosimilis*، *C. friedmannii* توسط محققان دیگر به عنوان مخمرهای مقاوم به سرما نیز گزارش شده‌اند (Selbmann *et al*. 2014).

در حال حاضر، معمولا از توالی‌یابی‌های تک‌ژنی برای ترسم درخت‌های فیلوژنتیکی استفاده می‌شود که فاقد حمایت بالا برای دودمان‌ها (Lineage) می‌باشد. در صورتی که داده‌های توالی چندژنی در ترسیم درخت فیلوژنتیکی شامل گردد، روابط بین فیزیولوژی و فیلوژنی مخمرها واضح‌تر خواهد شد (Wouter *et al*. 2003).

تعداد و تنوع نمونه‌ها، فصل‌های مختلف نمونه‌برداری و مشخصات بوم‌شناختی هر منطقه همگی از مواردی هستند که در نوع مخمرهای جداسازی شده اثر خواهند داشت. احتمال افزایش تنوع موجود با افزایش نمونه‌برداری نیز در نوع و تعداد میکروارگانیسم‌های جداسازی شده در هر پژوهش تاثیرگذار خواهد بود (Hughes *et al.* 2001).

نتایج این مطالعه نشان داد که بسیاری از مخمرهای خاک‌های ایران هنوز شناسایی و توصیف نشده‌اند و با یک بررسی کلی‌تر و جامع‌تر می‌توان تعداد زیادی گونه جدید برای میکوبیوتای ایران و حتی دنیا معرفی کرد.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه تبریز و همچنین گروه میکروبیولوژی دانشگاه پروجیا (ایتالیا) به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم و حمایت از انجام این تحقیق ابراز می‌نمایند.

References

Bandoni, R.J. 1979. *Fibulobasidium*: a new genus in the *Sirobasidiaceae*. Canadian Journal of Botany 57: 264–268.

Begerow, D., Bauer, R. & Oberwinkler F. 1997. Phylogenetic studies on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences of smut fungi and related taxa. Canadian Journal of Botany 75: 2045–2056.

Bergauer, P., Fonteyne, P.A., Nolard, N., Schinner, F. & Margesin, R. 2005. Biodegradation of phenol and phenolrelatedcompounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. Chemosphere 59: 909–918.

Bolano, A., Stinchi, S., Preziosi, R., Bistoni, F., Allegrucci, M., Baldelli, F., Martini, A. & Cardinali, G. 2001. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Research 1: 221–224.

Butinar, L., Spencer-Martins, I. & Gunde-Cimerman, N. 2007. Yeasts in high arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. Antonie van Leeuwenhoek 97: 277–289.

Deák, T. 2006. Environmental factors influencing yeasts. *In*: Rosa, C.A. & Peter, G. (eds). Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer-Verlag, Berlin, pp. 155–174.

Cantrell, S.A., Dianese, J.C., Fell, J., Gunde-Cimerman, N. & Zalar, P. 2011. Unusual fungal niches, Mycologia 103: 1161–1174.

Diddens, H.A. & Lodder, J. 1942. Die anaskosporogenen Hefen, II. Hälfte. North-Holland, Amsterdam.

de Garc´ıa, V., Brizzio, S., Libkind, D., Buzzini, P. & van Broock, M. 2007. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. FEMS Microbiology and Ecology 59: 331–341.

de Garcia, V., Brizzio, S., Russo, G., Rosa C.A., Boekhout, T., Theelen, B., Libkind, D. & van Broock, M. 2010. *Cryptococcus spencermartinsiae* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from glacial waters and apple fruits. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60: 707–711.

di Menna, M.E. 1954. Debaryomyces marama n. sp., isolatedfrom the air. Journal of General Microbiology 10: 65–67.

Dunlap, C.A., Evans, K.O., Theelen, B., Boekhout, T. & Schisler, D.A. 2007. Osmotic shock tolerance and membrane fluidity of cold-adapted *Cryptococcus*

flavescens OH 182.9, previously reported as *C. nodaensis*, a biocontrol agent of fusarium head blight. FEMS Yeast Research 7: 449–458.

Faizutdinova, R.N., Suzina, N.E., Duda, V.I., Petrovskaya. L.E. & Gilichinsky, D.A. 2005. Yeasts isolated from ancient permafrost. *In*: Castello, J.D. & Rogers, S.O. (eds). Life in Ancient Ice. Princeton University Press, Princeton, NJ, pp. 118–126.

Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. & Statzell-Tallman, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 1351–1371.

Fonseca, Á., Scorzetti, G. & Fell, J.W. 2000. Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. Canadian Journal of Microbiology 46: 7–27.

Fonseca, A. & In´acio, J. 2006. Phylloplane yeasts, pp. 263–301. *In*: Rosa, C.A. & Péter, G. (eds). The Yeast Handbook; Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, Springer-Verlag, Berlin.

Fonseca, A., Boekhout, T. & Fell, J.W. 2011. *Cryptococcus Vuillemin* (1901), pp. 1661–1737. *In*: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. (eds). The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed., Elsevier, Amsterdam.

Gadanho, M. & Sampaio, J.P. 2002. Polyphasic taxonomic of the basidiomycetous yeasts genus *Rhodotorula*: *R. glutinis sensu stricto* and *R. dairenensis* comb. nov. FEMS Yeast Research 2: 47–58.

Gadanho, M., Almeida, J.M.G.C.F. & Sampaio, J.P. 2003. Assessment of yeast diversity in a marine environment inthe south of Portugal by microsatellite-primed PCR. Antonie van Leeuwenhoek 84: 217–227.

Gadanho, M. & Sampaio, J.P. 2005. Occurrence and diversity of yeasts in the mid-atlantic ridge hydrothermal fields near the Azores Archipelago. Microbiology and Ecology 50: 408–417.

Gildemacher, P.R., Heijne, B., Houbraken, J., Vromans, T. Hoekstra, E.S. & Boekhout, T. 2004. Can phyllosphere yeasts explain the effect of scab fungicides on russeting of Elstar apples. European Journal of Plant Pathology 110: 929–937.

Gildemacher, P., Heijne, B., Silvestri, M., Houbraken, J., Hoekstra, E. & Boekhout, T. 2006. Interactions between yeasts, fungicides and apple fruit russeting. FEMS Yeast Research 6: 1149–1156.

Golubev, W.I. 1981. Novye kombinatsii drozhzhevykh gribov roda *Cryptococcus*. Mikologia I Fitopatologia 15: 467–468.

Golonka, A.M. 2002. Nectar-inhabiting microorganisms and the dioecious plant species Silene latifolia. PhD Thesis, Duke University, Durham, NC, pp. 87–95.

Golubev, W.I. 1993. *Rhodosporidium babjevae*, a new heterothallic yeast species (*Ustilaginales*). Systematic and Applied Microbiology 16: 445–449.

Golubev, W.I., Sampaio, J.P., Alves, L. & Golubev, N.W. 2004. *Cryptococcus festucosus* sp. nov.: a new hymenomycetous yeast in the Holtermannia clade. Canadian Journal of Microbiology 50: 1001–1006.

Goto, S. & Sugiyama, J. 1970. Studies on Himalayan yeasts and molds (IV). Several asporogenous yeasts, including two new taxa of *Cryptococcus*. Canadian Journal of Botany 48: 2097–2101.

Guffogg, S.O., Thomas-Hall, S., Holloway, P. & Watson., K. 2004. A novel psychrotolerant member of the hymenomycetous yeasts from Antarctica: *Cryptococcus watticus* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 275–277.

Hamamoto, M., Sugiyama, J. & Komagata, K. 1988. *Rhodosporidium kratochvilovae* sp. nov., a new basidiomycetous yeast species. Journal of General and Applied Microbiology34: 119–125.

Harrison, F.C. 1928. Cheese torulae. Transactions of the Royal Society of Canada 3rd. Ser. 21, Sect. 5: 341–380.

Herzberg, M., Fischer, R. & Titze, A. 2002. Conflicting results obtained by RAPD-PCR and large-subunit rDNA sequences in determining and comparing yeast strains isolated from flowers: a comparison of two methods. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 52: 1423–1433.

Hong, S.G., Lee, K.H., & Bae, K.S. 2002. Diversity of yeasts associated with natural environments in Korea. Journal of Microbiology 40: 55–62.

Hong, S.G., Lee, K.H., Kwak, J. & Bae, K.S. 2006. Diversity of yeasts associated with *Panax ginseng*. Journal of Microbiology 44: 674–679.

Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Richetts, T.H. & Bohannan, B.J.M. 2001. Coumting the uncountable: statical approaches to estimating microbial diversity. Applied Environmental Microbiology 67(10): 4399–4406.

Ikeda, R., Sugita, T. & Shinoda, T. 2000. Serological relationships of *Cryptococcus* spp.: distribution of antigenic factors in *Cryptococcus* and intraspecies diversity. Journal of Clinical Microbiology 38: 4021–4025.

Ina´cio, J., Portugal, L., Spencer-Martins, I. & Fonseca, A. 2005. Phylloplane yeasts from Portugal: seven novel anamorphic species in the *Tremellales* lineage of the *Hymenomycetes* (*Basidiomycota*) producing orange-coloured colonies. FEMS Yeast Research 5: 1167–1183.

Kurtzman, C.P. 1973. Formation of hyphae and chlamydospores by *Cryptococcus laurentii*. Mycologia 65: 388–395.

Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoek 73: 331–371.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. & Robert, V. 2011. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. pp. 87–110. *In*: Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. (eds). The Yeasts: A Taxonomic Study, 5th ed., Elsevier, Amsterdam.

Lachance, M.A. & Starmer, W.T. 1998. Ecology and yeasts. pp. 21–30. *In*: Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (eds). The yeasts, a taxonomic study. 4th ed. Elsevier, Amsterdam.

Lachance, M.A., Starmer, W.T., Rosa, C.A., Bowles, J.M., Stuart, J., Barker, F. & Janzen, D.H. 2001. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. FEMS Yeast Research 1: 1–8.

Laitila, A., Wilhelmson, A., Kotaviita, E., Olkku, J., Home. S. & Juvonen, R. 2006. Yeasts in an industrial malting ecosystem. Journal of Indian Microbiology and Biotechnology 33: 953–966

Libkind, D., Brizzio, S., Ruffini, A., Gadanho, M., van Broock, M. & Sampaio, P. 2003. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. Antonie van Leeuwenhoek 84: 313–322.

Libkind, D., Molin´e, M., Sampaio, J.P. & van Broock, M. 2009. Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation. FEMS Microbiology and Ecology 69: 353–362.

Lee, J.S., Kang, E.J., Kim, M.O., Lee, D.H., Bae, K.S. & Kim, C.K. 2001. Identification of *Yarrowia lipolytica* Y103 and its degradability of phenol and 4-chlorophenol. Journal of Microbiology and Biotechnology 11: 112–117.

Lodder, J. & Kreger-van Rij, N.J.W. 1952. The Yeasts, A Taxonomic Study. North-Holland, Amsterdam. 713 p.

Maksimova, I.A. & Chernov, I.Yu. 2004. Community structure of yeast fungi in forest biogeocenoses. Microbiology (Moscow) 73: 474–481 (Translated from Mikrobiologia 73: 558–566).

Montes, M.J., Belloch, C., Galiana, M., Garcia, M.D., Andres, C., Ferrer, S., Torres-Rodriguez, J.M. & Guinea, J 1999. Polyphasic taxonomy of a novel yeast isolated from antarctic environment; description of *Cryptococcus victoriae* sp. nov.

Systematic and Applied Microbiology 22: 97–105.

Middelhoven, W.J., Scorzetti, G. & Fell, J.W. 2004. Systematics of the anamorphic basidomycetous yeast genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum*, and *T. gamsii*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 975–986.

Nagahama, T., Hamamoto, M., Nakase, T. & Horikoshi, K. 2003. *Rhodotorula benthica* sp. nov. and *Rhodotorula calyptogenae* sp. nov., novel yeast species from animals collected from the deep-sea floor, and *Rhodotorula lysiniphila* sp. nov., which is related phylogenetically. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 53: 897–903.

Newell, S.Y. & Fell, J.W. 1970. The perfect form of a marine-occurring yeast of the genus *Rhodotorula*. Mycologia 62: 272–281.

Newell, S.Y. & Hunter, I.L. 1970. *Rhodosporidium diobovatum* sp. n., the perfect form of an asporogenous yeast (*Rhodotorula* sp.). Journal of Bacteriology 104: 503–508.

Nunez, F., Rodriguez, M.M., Cordoba, J.J., Bermudez, M.E. & Asensio, M.A. 1996. Yeast population during ripening of drycured Iberian ham. International Journal of Food Microbiology 29: 271–280.

Pollacci, G. & Nannizzi, A. 1927. I Miceti Patogenidell'Uomo e degli Animali, Vol. 5. Capelli, Bologna, pp. 228–241.

Reiersöl, S. 1955. Species of *Rhodotorula* isolated from laryngeal swabs. Antonie van Leeuwenhoek 21: 286–289.

Robiglio, A., Sosa, C.M., Lutz, M.C., Lopes, C.A. & Sangorrin, M.P. 2011. Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. International Journal of Food Microbiology 147: 211–216.

Romer, M., Hammer, E., Cazau, M.C., & Arambarri, A.M. 2002. Isolation and characterization of biarylic structuredegrading yeasts: hydroxylation potential of dibenzofuran. Enviromental. Pollution 118: 379–382.

Russo, G., Libkind, D., Sampaio, J.P. & van Broock, M.R. 2008. Yeast diversity in the acidic Rio Agrio-Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina). FEMS Microbiology and Ecology 65: 415–424.

Sampaio, J.P, Gadanho, M., Santos, S., Duarte, F., Pais, C., Fonseca, A. & Fell, J.W. 2001. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. International Journal of Systematic Evolutary and Microbiology 51: 687–697.

Sampaio, J.P., Weiß, M., Gadanho, M. & Bauer, M. 2002. New taxa in the *Tremellales*: *Bulleribasidium oberjochense* gen. et sp. nov., *Papilotrema bandonii* gen. et sp. nov. and *Fibulobasidium murrhardtense* sp. nov. Mycologia 94: 873–887.

Sampaio, J.P. 2004. Diversity, phylogeny and classification of basidiomycetous yeasts, pp. 49–80. *In*: Agerer, R., Blanz, P. & Piepenbring, M. (eds). Frontiers in Basidiomycete Mycology, IHW Verlag, Eching, 49 pp.

Selbmann, L., Zucconi, L., Onofri, S., Cecchini, C., Isola, D., Turchetti., B. & Buzzini. P. 2014. Taxonomic and phenotypic characterization of yeasts isolated from worldwide cold rock-associated habitats. Fungal Biology 118 (1): 61–71.

Scorzetti, G., Fell, J.W., Fonseca, A. & Staltzell-Tallman, A. 2002. Systematic of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. FEMS Yeast Research 2: 495–517.

Skinner, C.E. 1950. Generic name for imperfect yeasts, *Cryptococcus* or *Torulopsis*? The American Midland Naturalist Journal 43: 242–250.

Slavikova, E. & Vadkertiova, R. 2000. The occurrence of yeasts in the forest soils. Journal of Basic Microbiology 40: 207–212.

Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts M.G. & van Rensburg, P. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. Journal of Applied Microbiology 91: 182–190.

Sugita, T., Takashima, M., Ikeda, R., Nakase, T., & Shinoda, T. 2001. Intraspecies diversity of *Cryptococcus albidus* isolated from human as revealed by sequences of internal transcribed spacer regions. Microbiology and Immunology 45: 291–297.

Takashima, M., Sugita, T., Shinoda, T. & Nakase, T. 2001. Reclassification of the *Cryptococcus humicola* complex. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 2199–2210.

Turchetti, B., Buzzini, P., Goretti, M., Branda, E., Diolaiuti, G., D'Agata, C., Smiraglia, C. & Vaughan-Martini, A. 2008. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. FEMS Microbiology Ecology 63: 73–83.

Vishniac, H.S. 1985. *Cryptococcus friedmannii*, a new species of yeast from the Antarctic. Mycologia 77: 149–153.

Vishniac, H.S. & Kurtzman, C.P. 1992. *Cryptococcus antarcticus* sp. nov. and *Cryptococcus albidosimilis* sp. nov., basidioblastomycetes from Antarctic soils. International Journal of Systematic Bacteriology Microbiology 42: 547–553.

Vishniac, H.S. 1995. Simulated in situ competitive ability and survival of a representative soil yeast, *Cryptococcus albidus*. Microbiology and Ecology 30: 309–320.

Vishniac, H.S. 2006. A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. Microbiology and Ecology 52: 90–103.

Wouter, J.M. & Kurtzman, C.P. 2003. Relation between phylogeny and physiology in some ascomycetous yeasts. Antonie van Leeuwenhoek 83: 69–74.

Wuczkowski, M., Sterflinger, K., Kraus, G.F., Klug, B. & Prillinger, H. 2003. Diversity of microfungi and yeasts in soils of the alluvial zone national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria (''Nationalpark Donauauen''). Bodenkultur 54: 109–118.

Wuczkowski, M., Passoth, V., Turchetti, B., Andersson, A.C., Olstorpe, M., Laitila, A., Theelen, B., van Broock, M., Buzzini, P., Prillinger, H., Sterflinger, K., Schnürer, J., Boekhout, T. & Libkind, D. 2010. Description of *Holtermanniella takashima* sp. nov., *Holtermanniella* gen. nov. and proposal of the order *Holtermanniales* to accommodate Tremellomycetous yeasts of the *Holtermania* clade. International Journal of Systematic Evolutionary and Microbiology 9: 180–194.