



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบพืชและความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญ
ของพืช

Diversity of Phylloplane Yeasts and Their Ability to Produce Plant Growth Promoter

นามผู้วิจัย นางสาวน้ำผึ้ง คุ้มจันกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ้มทอง, D.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ศศิธร จินตามรกฏ, ปร.ค.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัชววัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบพืชและความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช

Diversity of Phylloplane Yeasts and Their Ability to Produce Plant Growth Promoter

โดย

นางสาวน้ำผึ้ง คู่จันทกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำผึ้ง คู่วิจัยกุล 2554: ความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบพืชและความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ้มทอง, D.Eng. 176 หน้า

ศึกษาความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบพืชโดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ รวม 97 ตัวอย่าง นำมาแยกยีสต์ด้วยเทคนิคการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว yeast extract-malt extract (YM) ที่เติมคลอแรมฟินิคอล 0.02% และโซเดียมโทรฟิโอะเนต 0.025% และเทคนิคการเพิ่มจำนวน 3 รอบในอาหารเหลว 0.5% methanol-yeast nitrogen base ได้ยีสต์ทั่วไปรวมรากล้ายีสต์ 137 สายพันธุ์ และเมทิลโลโทรฟิโกยีสต์ 9 สายพันธุ์ และจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ large subunit rRNA gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ผลการจัดจำแนกแสดงว่า ยีสต์ทั่วไปส่วนใหญ่ (119 สายพันธุ์) เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว โดยเป็นแอสโคไมซิดยีสต์มากถึง 99 สายพันธุ์ใน 14 สกุล 35 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida amphixiae*, *C. apicola*, *C. etchellsii*, *C. glabrata*, *C. jaroonii*, *C. maltosa*, *C. metapsilosis*, *C. nivariensis*, *C. nodaensis*, *C. parapsilosis*, *C. potacharoeniae*, *C. rugosa*, *C. sorboxylosa*, *C. stigmatis*, *C. tropicalis*, *C. trypodendroni*, *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces nepalensis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *H. opuntiae*, *H. thailandica*, *Hyphopichia burtonii*, *Kazachstania siamensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. thermotolerans*, *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia koreensis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia galeiformis*, *P. kudriavzevii*, *P. rhodanensis*, *Starmerella meliponinorum*, *Torulasporea delbrueckii*, *T. pretoriensis* และ *Wickerhamomyces edaphicus* ในขณะที่เป็นแบสิดิโอไมซิดยีสต์ 8 สายพันธุ์ 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Pseudozyma aphidis*, *Sporidiobolus ruineniae*, *Trichosporon asahii*, *T. mucoides* และ *T. mycotoxinivorans* ส่วน 12 สายพันธุ์ที่จัดเป็นรากล้ายีสต์ คือ *Aureobasidium pullulans* นอกจากนั้นพบ 5 สายพันธุ์เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 4 สปีชีส์ 10 สายพันธุ์อาจเป็นยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่และที่สำคัญพบ 3 สายพันธุ์ เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ซึ่งได้ศึกษาและเสนอเป็น *C. sakaeensis* sp. nov. และ *C. sirachaensis* sp. nov. สำหรับเมทิลโลโทรฟิโกยีสต์ 9 สายพันธุ์ จัดจำแนกได้เป็นสปีชีส์ *Ogataea polymorpha* (1 สายพันธุ์), มี 2 สายพันธุ์ อาจเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ และ 6 สายพันธุ์ จัดเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ใน 4 สปีชีส์ซึ่งได้ศึกษาและเสนอเป็น *C. chumphonensis* sp. nov. (1 สายพันธุ์), *C. matranensis* sp. nov. (1 สายพันธุ์), *O. phyllophila* sp. nov. (3 สายพันธุ์) และ *Ogataea* sp. LN18 (1 สายพันธุ์)

สำหรับความสามารถของยีสต์ที่แยกได้ ในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิก พบว่ามียีสต์ที่สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิก 51 สายพันธุ์ ใน 25 สปีชีส์ โดยมี 9 สายพันธุ์ จาก 4 สปีชีส์ ที่สร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกได้ในช่วง 84.3-314.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ได้แก่ *C. amphixiae* (1 สายพันธุ์), *C. maltosa* (5 สายพันธุ์), *C. rugosa* (2 สายพันธุ์) และ *Sp. ruineniae* (1 สายพันธุ์) และเมื่อเพาะเลี้ยงในพลาสติกพบว่า *Sp. ruineniae* LM015 สร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิก ได้สูงสุด คือ 436.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Nampueng Koowadjanakul 2011: Diversity of Phylloplane Yeasts and Their Ability to Produce Plant Growth Promoter. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Professor Savitree Limtong, D.Eng. 176 pages.

Diversity of phylloplane yeasts was studied by isolation and identification of yeasts from surface of leaves collected from various areas. A total of 137 yeast strains and 9 methylotrophic yeast strains, were respectively isolated by an enrichment technique using yeast extract-malt extract broth supplemented with 0.025% sodium propionate and 0.02% chloramphenicol and by three-consecutive enrichment in 0.5% methanol-yeast nitrogen broth from 97 leaf samples. Identification the basis of analysis of the D1/D2 domain of the large subunit ribosomal RNA gene revealed that most of them (99 strains) were belonging to known ascomycetous species in 14 genera, 35 species i.e. *Candida amphixiae*, *C. apicola*, *C. etchellsii*, *C. glabrata*, *C. jaroonii*, *C. maltosa*, *C. metapsilosis*, *C. nivariensis*, *C. nodaensis*, *C. parapsilosis*, *C. potacharoeniae*, *C. rugosa*, *C. sorboxylosa*, *C. stigmatis*, *C. tropicalis*, *C. trypodendroni*, *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces nepalensis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *H. opuntiae*, *H. thailandica*, *Hyphopichia burtonii*, *Kazachstania siamensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. thermotolerans*, *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia koreensis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia galeiformis*, *P. kudriavzevii*, *P. rhodanensis*, *Starmerella meliponinorum*, *Torulaspora delbrueckii*, *T. pretoriensis* and *Wickerhamomyces edaphicus*. While 8 strains were identified to be 5 known basidiomycetous species i.e. *Pseudozyma aphidis*, *Sporidiobolus ruineniae*, *Trichosporon asahii*, *T. mucoides* and *T. mycotoxinivorans*, and 12 strains were known species of yeast-like fungi, *Aureobasidium pullulans*. The other 5 strains were similar to undescribed species, 10 strains could be known or new species and 3 strains were found to be 2 new species that were studied and proposed as *C. sakaensis* sp. nov. and *C. sirachaensis* sp. nov. Among 9 strains of methylotrophic yeast, 1 strains was identified to be *Ogataea polymorpha*, 2 strains could be known or new species and 6 strains were found to 4 new species, which were studied as proposed as *C. chumphonensis* sp. nov., *C. mattranensis* sp. nov., *O. phyllophila* sp. nov. and *Ogataea* sp. LN18.

Investigation on indole-3-acetic acid (IAA) production of all 137 strains revealed that 51 strains of 25 species could produced IAA and 9 strains yielded 84.3-314.3 mg/l of IAA when cultivated in test tube. They were *C. amphixiae* (1strain), *C. maltosa* (5 strains), *C. rugosa* (2 strains) and *Sp. ruineniae* (1 strain). By shake flask cultivation *Sp. ruineniae* LM015 showed the highest IAA production of 436.4 mg/l.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. สาวิตรี ลิ้มทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งให้ความช่วยเหลือสนับสนุนการทำวิจัยอย่างดียิ่ง และขอกราบขอบพระคุณ ดร. ศศิธร จินดามรกฏ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความอนุเคราะห์ดูแลเสมอมา รวมทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาและงานวิจัยบางส่วน

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทนา สีสุข ประธานการสอบ และ ดร. บัณฑิต ฝั่งสินธุ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ พี่ เพื่อน และน้องๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกคนที่ให้ความอบอุ่นตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา รวมทั้งให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ อย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ พ่อและแม่ ที่ช่วยอุดหนุนการศึกษา รวมทั้งให้กำลังใจ และให้คำปรึกษาที่ดีตลอดมา

น้ำผึ้ง คู่วังจันกุล
พฤษภาคม 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	37
สรุปผล	137
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	140
ภาคผนวก	150
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	151
ภาคผนวก ข ผลงานที่ได้รับการยอมรับให้ตีพิมพ์ในวารสาร Antonie van Leeuwenhoek	164
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	176

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชนิดของยีสต์ที่พบบนผิวใบพืชในประเทศต่างๆ	8
2	สถานะที่เหมาะสมในการแยกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ของ van Dijken และ Harder (1974)	11
3	เมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างชนิดต่างๆ ในประเทศต่างๆ	12
4	แหล่งที่เก็บตัวอย่างและผลการแยกยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิเคียสต์จากตัวอย่างใบพืชในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยจำนวน 20 แห่ง	39
5	ผลการทดสอบการเจริญของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ บนอาหารแข็ง YM และอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB	48
6	ผลการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปสายพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว	52
7	ยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว	63
8	ผลการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปสายพันธุ์ที่เหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย	67
9	ผลการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่	69
10	ยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายและสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่	70
11	ผลการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปสายพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์ใหม่	74
12	ผลการจัดจำแนกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์สายพันธุ์ที่เหมือนกับสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วและสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่	76
13	ผลการจัดจำแนกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์สายพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์ใหม่	79
14	ผลการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปที่แยกได้จากอาหาร 0.5% methanol-YNB ทั้งสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วและสปีชีส์ที่อาจเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่	81
15	แสดงชนิดของยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างใบพืชแต่ละชนิด	119
16	แสดงการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกและการเจริญโดยยีสต์ที่แยกได้จากใบพืชเมื่อเลี้ยงในอาหาร YPD ที่เติมแอล-ทริปโตเฟน 1 เปอร์เซ็นต์ ในหลอดทดสอบและบ่มแบบเขย่านาน 7 วัน	129
17	แสดงปริมาณกรดอินโดล-3-อะซิดิกที่สร้างโดยยีสต์ 11 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในพลาสติกและบ่มแบบเขย่า	135

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดง rRNA genes ; 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene, LSU rRNA gene, ETS (external transcribed spacer) และ ITS (internal transcribed spacer)	17
2	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว ในวงศ์ Candidaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด	60
3	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว ในวงศ์ Saccharomycetaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด	61
4	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว ในวงศ์ Dothideaceae, Metschnikowiaceae, Saccharomycodaceae, <i>Sporidiobolus ruineniae</i> , <i>Trichosporon asahii</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด	62
5	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย สปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุดที่อธิบายแล้ว และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุดที่ยังไม่มีการอธิบาย	71
6	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด	72
7	ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิเคียสที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว สปีชีส์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด	77
8	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ <i>Candida sirachaensis</i> sp. nov. (LM008 ^T) และสปีชีส์ที่สัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene	83

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	สัณฐานวิทยาของเซลล์ของ <i>Candida sirachaensis</i> sp. nov. (LM008 ^T)	86
10	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ <i>Candida sakaeoensis</i> sp. nov. (LM078 ^T) และสปอร์ที่สัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene	88
11	สัณฐานวิทยาของเซลล์ของ <i>Candida sakaeoensis</i> sp. nov. (LM078 ^T)	92
12	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ <i>Ogataea phyllophila</i> sp. nov. (LN12, LN14 ^T และ LN16), <i>Candida chumphonensis</i> sp. nov. (LN15 ^T), <i>Candida mattranensis</i> sp. nov. (LN17 ^T) และสปอร์ที่สัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene	94
13	สัณฐานวิทยาของเซลล์ของ <i>Ogataea phyllophila</i> sp. nov. (LN14 ^T)	98
14	สัณฐานวิทยาของเซลล์ของ <i>Candida chumphonensis</i> sp. nov. (LN15 ^T)	102
15	สัณฐานวิทยาของเซลล์ของ <i>Candida mattranensis</i> sp. nov. (LN17 ^T)	106
16	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ <i>Ogataea</i> sp. LN18 (LN18 ^T) และสปอร์ที่สัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene	108
17	สัณฐานวิทยาของเซลล์ของ <i>Ogataea</i> sp. LN18 (LN18 ^T)	112
18	แสดงปริมาณของแอสโคไมซ์ซีสต์, แบสิดิโอไมซ์ซีสต์ และราที่คล้ายยีสต์ที่แยกได้จากผิวใบพืช	115
19	แสดงจำนวนของตัวอย่างที่แยกได้ยีสต์อย่างน้อย 1 สปีชีส์และตัวอย่างที่ไม่สามารถแยกได้ยีสต์เลย	117

ความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบพืช
และความสามารถในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช

Diversity of Phylloplane Yeasts
and Their Ability to Produce Plant Growth Promoter

คำนำ

ผิวใบพืชเป็นแหล่งที่มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่หลายชนิดรวมทั้งยีสต์ ที่เป็นเช่นนี้ก็เนื่องมาจากผิวใบพืชมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและสารอาหารอย่างต่อเนื่อง สารอาหารบนผิวใบพืชอาจสร้างมาจากจุลินทรีย์ จากที่เซลล์พืชหลั่งออกมา หรือมาจากดินบริเวณที่พืชนั้นเจริญอยู่ สารอาหารที่พบบนผิวใบพืชอาจมีทั้งสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ โดยกลูโคส, ฟรุกโตส, ซูโครส, กรดอินทรีย์, กรดอะมิโน, เมทานอล และเกลือหลายชนิด เป็นสารหลักๆ ที่หลั่งออกมาจากเนื้อเยื่อของใบพืช สารเหล่านี้จะเป็นแหล่งสารอาหารและแหล่งพลังงานให้กับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนผิวใบพืช (Peter *et al.*, 2007; Baoguo *et al.*, 2008)

จุลินทรีย์ที่พบบนผิวใบพืชมีทั้งแบคทีเรียและรา รวมทั้งยีสต์ โดยแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มแรกที่พบในขณะที่ใบพืชยังอ่อน และเป็นจุลินทรีย์ที่มีจำนวนมากที่สุด (Rosa and Peter, 2006) ส่วนราที่พบส่วนใหญ่เป็นยีสต์ และรา Hyphomycetes ที่สร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว เช่น *Aureobasidium pullulans* สำหรับยีสต์บนผิวใบพืชไม่ว่าจะเป็นพืชในเขตร้อน เขตอบอุ่นหรือเขตหนาว ส่วนใหญ่เป็นเบสิดิโอมีซีตัสยีสต์ เช่น ยีสต์ในสกุล *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Laphrina* และ *Diozegia* (Inacio *et al.*, 2005; Rosa and Peter, 2006; Wang *et al.*, 2007, 2008) ในขณะที่แอสโคไมซีตัสยีสต์พบน้อยกว่า (Azeredo *et al.*, 1998; Rosa and Peter, 2006) เช่น *Ogataea allantospora* ซึ่งเป็นเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ (methylotrophic yeast) ซึ่งใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ด้วย (Peter *et al.*, 2007) การพบยีสต์บนใบพืชที่แตกต่างกันนั้นเชื่อว่าเป็นเพราะสารต่างๆ ที่มีอยู่บนใบพืช ไม่ใช่เป็นเพราะความแตกต่างของชนิดพืชและสภาพภูมิศาสตร์

การใช้ประโยชน์ของยีสต์ส่วนใหญ่เป็นการใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม การใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ โดยเฉพาะทางการเกษตรมีน้อย ดังนั้น การหายีสต์ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรจึงเป็นงานที่น่าสนใจ โดยในขณะนี้มียางานว่า ยีสต์บางชนิดสามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชได้ (plant growth promoter) (Nassar *et al.*, 2005) โดยยีสต์เหล่านั้นจะผลิตสารประเภทออกซิน (auxin) บางชนิด เช่น กรดอินโดล-3-อะซีติก(indole-3-acetic acid: IAA) และ กรดอินโดล-3-บิวทีริก (indole-3-butyric acid: IBA) ซึ่งทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญของพืช โดยเพิ่มการยึดตัวของเซลล์ เพิ่มการแบ่งเซลล์ และเพิ่มการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืช

เนื่องจากการวิจัยยีสต์บนผิวใบพืชในประเทศไทยยังมีน้อยและการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการค้นหายีสต์ที่สามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืชยังไม่มีเลย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบพืชโดยการแยกและจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิเคียสบนผิวใบพืช นอกจากนั้นทำการตรวจความสามารถของยีสต์ที่รวบรวมได้เหล่านั้นในการสร้างสารส่งเสริมการเจริญของพืช

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบพืช
2. เพื่อค้นหายีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงาน
3. เพื่อตรวจการสังเคราะห์สารส่งเสริมการเจริญของพืช (plant growth promoter) ของยีสต์บนผิวใบพืชที่แยกได้



การตรวจเอกสาร

ยีสต์ คือราชนิดหนึ่งที่มีการดำรงชีวิตเป็นแบบเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างแตกต่างกันไป เช่น รูปร่างกลม, รี, สามเหลี่ยม หรือรูปร่างแบบลูกมะนาว เป็นต้น ยีสต์บางชนิดจะมีการสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) หรือเส้นใยแท้ (true mycelium) ขึ้นมาด้วย ยีสต์ส่วนใหญ่จะมีการเจริญเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีการแตกหน่อ (budding) แต่บางชนิดอาจมีการเจริญเพิ่มจำนวนโดยวิธีการแบ่งเซลล์ (fission) หรือโดยวิธีการอื่น ยีสต์บางชนิดมีการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ ซึ่งอาจเป็นแอสโกสปอร์หรือเบสิดิโอสปอร์ ยีสต์ที่สร้างแอสโกสปอร์ เรียกโดยทั่วไปว่าแอสโคไมยซีตัสยีสต์ (ascomycetous yeast) ส่วนยีสต์ที่สร้างเบสิดิโอสปอร์ เรียกว่าเบสิดิโอไมยซีตัสยีสต์ (basidiomycetous yeast) โดยทั่วไปแล้ว ยีสต์สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งของคาร์บอนได้หลากหลายชนิดมาก เช่น น้ำตาล, คาร์โบไฮเดรต, กรดอินทรีย์, ไฮโดรคาร์บอน หรือกรดอินทรีย์ เป็นต้น ปกติแล้วยีสต์ส่วนใหญ่จะมีแหล่งที่อยู่แบบค่อนข้างจำเพาะ แต่ในบริเวณที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลค่อนข้างสูงก็จะพบยีสต์ได้มากกว่าบริเวณอื่น ส่วนยีสต์บางชนิดอาจพบได้เฉพาะบางพื้นที่เท่านั้น ขึ้นกับความต้องการที่จำเพาะของยีสต์แต่ละชนิดต่อสารอาหารในพื้นที่นั้นๆ

ยีสต์มีความเกี่ยวข้องกับมนุษย์มานานหลายศตวรรษ โดยส่วนใหญ่มักมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการหมักน้ำตาลผลไม้ การทำให้ขนมปังเกิดการพองตัวขึ้นหรือขนมปังฟูขึ้น หรือทำให้อาหารบางชนิดมีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันนี้ยีสต์ยังมีความสำคัญมากขึ้นเนื่องจากสามารถนำมาใช้ในกระบวนการหมักต่างๆ การผลิตสาร เช่น วิตามิน, ไขมัน และโปรตีน นอกจากนี้แล้วยีสต์ยังนำมาใช้ในการศึกษาพื้นฐานทางด้านชีวเคมีและกระบวนการทางเมแทบอลิซึมของเซลล์ยูคาริโอต แต่ไม่ว่าอย่างไรก็ตาม ยังมียีสต์บางชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับพืช สัตว์ และมนุษย์อยู่ด้วย ซึ่งอาจสร้างความเสียหายให้กับอาหารและวัสดุอื่นๆ ได้

โดยธรรมชาติแล้วยีสต์มีลักษณะเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดี่ยวจึงทำให้ยีสต์ดำรงชีวิตอยู่ได้ดีทั้งในสถานะอาหารที่เป็นของเหลว อาหารที่มีความชื้นและบนพื้นผิวที่ไม่สม่ำเสมอ และยีสต์ยังสามารถเจริญได้ง่ายในที่ซึ่งมีอาหารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเพียงพอ โดยเป็นสารอาหารที่สามารถละลายน้ำได้ เช่น น้ำตาล และกรดอะมิโน จึงเป็นเหตุผลว่าทำไมจึงพบยีสต์ได้ทั่วไปบนผิวใบพืช, ผลไม้, รากพืช, สารที่หลั่งออกมาจากต้นไม้, แมลง, ดิน, น้ำ, สัตว์ และอากาศ นอกจากนั้น เรายังอาจสามารถพบยีสต์ได้ในร่างกายของสัตว์ เช่น ภายในลำไส้ โดยส่วนใหญ่มักจะอยู่ร่วมกันแบบฝ่ายหนึ่งได้ประโยชน์อีกฝ่ายหนึ่งไม่ได้ไม่เสียประโยชน์ (commensalisms) ยีสต์ส่วนใหญ่มักพบใน

ที่ขึ้นและเป็นกรดและพบได้น้อยในสภาพที่เป็นค้าง จากความหลากหลายต่างๆ เหล่านี้ทำให้เห็นว่า ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ง่ายและพบได้ทั่วไป (Satyanarayana and Kunze, 2009)

ยีสต์เหมือนจุลินทรีย์เฮเทอโรโทรฟ (heterotroph) ทั่วๆ ไปที่มีความต้องการสารประกอบคาร์บอน ในโตรเจน ฟอสฟอรัส ธาตุอาหารรอง และ growth factors ชนิดอื่นๆ โดยทั่วไปในธรรมชาติมักจะพบยีสต์อยู่ชนิดเดียว แต่มักพบอยู่ปะปนกับยีสต์ชนิดอื่นๆ หรือกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้น การใช้เทคนิคในการคัดเลือก (selective technique) ยีสต์จึงมีความสำคัญ และได้มีการนำมาใช้ในการแยกและเพาะเลี้ยงยีสต์ โดยการใช้อาหารที่ยีสต์สามารถเจริญได้ดีในขณะที่ยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรีย (Satyanarayana and Kunze, 2009)

1. ยีสต์บนผิวใบพืช

ผิวใบพืช (phylloplane หรือ phyllosphere) หมายถึงพื้นผิวด้านนอกของใบพืช ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่ที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์หลายชนิด (Peter *et al.*, 2007) ได้แก่ แบคทีเรีย, รา และสาหร่าย รวมทั้งยีสต์ (Baoguo *et al.*, 2008) และที่พบจำนวนน้อย ได้แก่ โปรโตซัว และไส้เดือนฝอย (Lindow and Brandl, 2003) โดยจุลินทรีย์ที่พบบนผิวใบพืชนั้นอาจพบได้ทั้งที่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคและไม่ก่อโรค ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อผิวใบพืช เช่น การตรึงไนโตรเจน, การส่งเสริมการเจริญของพืช และการควบคุมการก่อโรคของเชื้อก่อโรคในพืช (Baoguo *et al.*, 2008) และโดยส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มแรกที่พบบนใบพืชที่ยังอ่อนและเป็นจุลินทรีย์ที่มีจำนวนมากที่สุด ส่วนราที่พบส่วนใหญ่เป็นยีสต์ และรา Hyphomycetes ที่สร้างสปอร์อย่างรวดเร็ว (Nix-Stohr *et al.*, 2007)

ผิวใบพืชเป็นแหล่งที่มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่หลายชนิดรวมทั้งยีสต์ ที่เป็นเช่นนี้ก็เนื่องมาจากผิวใบพืชมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและสารอาหารอย่างต่อเนื่อง สารอาหารบนผิวใบพืชอาจสร้างมาจากจุลินทรีย์ จากสารที่เซลล์พืชหลั่งออกมา หรือมาจากดินบริเวณที่พืชนั้นเจริญอยู่ สารอาหารที่พบบนผิวใบพืชทั้งที่เป็นสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์นั้น ส่วนใหญ่ที่พบเช่น น้ำตาลกลูโคส, ฟรุกโตส, ซูโครส, กรดอินทรีย์, กรดอะมิโน, เมทานอล และเกลือหลายชนิด ซึ่งเป็นสารหลักๆ ที่หลั่งออกมาจากเนื้อเยื่อของใบพืช สารเหล่านี้จะเป็นแหล่งสารอาหารและแหล่งพลังงานให้กับจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนผิวใบพืช แม้ว่าจุลินทรีย์จะสามารถเจริญได้บนผิวใบพืชที่มีสารอาหารจำกัด แต่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ความชื้น, อุณหภูมิ, ความดันออสโมติก และรังสี

ยู่ไว้ รวมทั้งสภาวะที่มีความเป็นพิษสามารถส่งผลต่อจำนวน การเจริญและชนิดของจุลินทรีย์บนผิวใบพืชได้ (Peter *et al.*, 2007; Baoguo *et al.*, 2008)

พืชสร้างเมทานอลอยู่ภายในใบพืชปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอายุของใบพืช แต่โดยส่วนใหญ่แล้วมักพบว่า พืชจะสร้างเมทานอลได้น้อยลงเมื่อใบพืชมีอายุมากขึ้น จากนั้นอาจมีการหลั่งเมทานอลออกมาที่ผิวใบ โดยผ่านทางปากใบ จากการทดลองของ Nemecek-Marshall *et al.* (1995) พบว่า เมทานอล ประมาณ 94-97 เปอร์เซ็นต์ ในพืช 4 ชนิด สร้างภายในใบพืชและหลั่งออกมาที่ผิวใบตรงบริเวณปากใบระหว่างที่พืชหายใจ จึงมีความเป็นไปได้ว่า เมทานอลที่สะสมอยู่ในใบพืชมีผลต่อจำนวนของยีสต์กลุ่มเมทิล โล โทรฟ (Fall and Benson, 1996) ยีสต์เหล่านี้ส่วนใหญ่มักเป็นแอสโคไมซีตส์ยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Kurtzman and Fell, 1998; Barnett *et al.*, 2000) แต่ยีสต์บนผิวใบพืชส่วนใหญ่ที่พบมักเป็นแบสซิไลโอไมซีตส์ยีสต์มากกว่า แอสโคไมซีตส์ยีสต์ (Fonseca and Inacio, 2006) เนื่องจากแอสโคไมซีตส์ยีสต์ส่วนใหญ่มักจะเจริญในที่ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลค่อนข้างสูง เช่น ในน้ำหวานของดอกไม้, น้ำที่หลั่งออกมาจากต้นไม้ ในเนื้อหรือน้ำของผลไม้ แต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานอีกจำนวนหนึ่งซึ่งแสดงว่าพบแอสโคไมซีตส์ยีสต์บนผิวใบพืช เช่น *Candida oleophila*, *Metschnikowia pulcherrima* และ *Debaryomyces hansenii* (Glushakova *et al.*, 2006)

ยีสต์บางชนิดที่แยกจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันรวมถึงที่แยกจากผิวใบพืชจะทนต่อการเจริญในบริเวณที่มีความเข้มข้นของสารอาหารต่ำ โดยเฉพาะสารประกอบไนโตรเจน ยีสต์ทุกชนิดต้องการคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นสารอาหารหลักในการดำรงชีวิตและการเจริญ ในขณะที่ความต้องการแร่ธาตุและวิตามินจะหลากหลายแตกต่างกันไปในยีสต์แต่ละสปีชีส์ Nix-Stohr *et al.* (2007) รายงานว่ายีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายสำหรับการเจริญ แต่การเกิดเมแทบอลิซึมก็ยังต้องการน้ำตาล, โพลีแซคคาไรด์ และสารโมเลกุลใหญ่ชนิดอื่นๆ เช่น โปรตีนและไขมัน ยีสต์สามารถเมแทบอลิซึมไนโตรเจนได้ทั้งที่เป็นสารอนินทรีย์ (เช่น แกลูตามิโนเนียม) และสารอินทรีย์ (เช่น กรดอะมิโนและยูเรีย) แต่จนถึงขณะนี้ก็ยังไม่มีการค้นพบว่าสารอาหารชนิดใดเป็นตัวกำหนดการพัฒนา, การเกิดและการเจริญของยีสต์บนผิวใบพืช

สาวิตรี (2549) ได้กล่าวไว้ว่า ในการแยกยีสต์นั้นควรจะต้องกำหนดจุดประสงค์ให้แน่นอนก่อนว่าต้องการยีสต์กลุ่มใด ยีสต์ทั้งหมดหรือยีสต์ที่มีลักษณะเฉพาะ แต่หลักที่สำคัญคือ การแยกนั้นต้องไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางชีวภาพ ความต้องการธาตุอาหาร และสภาพทาง

กายภาพของยีสต์ระหว่างการแยก และในการแยกยีสต์ทุกขั้นตอนต้องใช้เทคนิคที่ป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ ได้

อาหารยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์มอลต์เอ็กซ์แทรกซ์ (Yeast extract Malt extract: YM) เป็นอาหารที่มีสารอาหารจำเป็นเพียงพอ โดยการปรับ pH ให้อยู่ที่ประมาณ 3.7 และเติมสารปฏิชีวนะลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น เดิมคลอแรมฟินิโคล 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร (Kurtzman and Fell, 1998) และนอกจากนั้นยังสามารถเติมสารยับยั้งการเจริญของรา (fungistatic) ลงไปด้วย เพื่อป้องกันการเจริญของราอื่นที่ไม่ต้องการ แต่ในการใช้สารยับยั้งการเจริญของรานั้น จะต้องเลือกใช้อย่างระมัดระวังเนื่องจากสารยับยั้งการเจริญของราเหล่านี้อาจยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้เช่นกัน (Yarrow, 1998)

สำหรับวิธีการแยกยีสต์บนผิวใบพืชนั้น มักทำโดยการส่งเสริมให้ยีสต์เจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่เรียกว่า Enrichment technique เนื่องจากตัวอย่างใบพืชเป็นตัวอย่างที่มีจำนวนยีสต์น้อย แต่วิธีนี้ไม่สามารถใช้นับจำนวนยีสต์ในตัวอย่างที่นำมาศึกษาได้ เพราะยีสต์บางชนิดมีการเพิ่มจำนวนในระหว่างการแยก และบางชนิดก็ถูกกวดการเจริญในระหว่างการแยกเช่นกัน โดยวิธีการแยกยีสต์ คือ ใส่ตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ส่งเสริมการเจริญของยีสต์ชนิดที่ต้องการนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนนาน 12-24 ชั่วโมง หรือจนยีสต์เจริญ นำอาหารเหลวที่มียีสต์อยู่ไปลาก (streak) หรือกระจาย (spread) ลงบนผิวหน้าอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อ เมื่อยีสต์เจริญขึ้นมาจึงเก็บโคโลนีแล้วจึงนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป แต่สภาวะการเจริญแบบนี้อาจส่งเสริมการเจริญของราเส้นใยเช่นกัน ดังนั้นในบางครั้งเวลาบ่มอาจทำโดยตั้งไว้เฉยๆ แทนการเขย่าเพื่อลดออกซิเจนที่จะกระจายลงไปในการและไปส่งเสริมการเจริญของรา แม้ว่าวิธีการนี้จะทำให้เกิดการหมักและอาจแยกได้เฉพาะยีสต์ที่มีความสามารถในการหมัก (fermentative yeast) ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเท่านั้น (สาวิตรี, 2549)

ยีสต์ที่แยกได้จากผิวใบพืชที่พบบ่อยที่สุด คือ ยีสต์ที่มีสีชมพูหรือแดง (red yeast) เช่น *Sporobolomyces* spp. เช่น *Sporobolomyces roseus* และ *Rhodotorula* spp. เช่น *Rhodotorula glutinis* และ *Rh. mucilaginosa* และยีสต์ที่มีสีขาวที่พบหลักๆ คือ *Cryptococcus* spp. เช่น *Cryptococcus albidus*, *Cr. magnus* และ *Cr. laurentii* เป็นต้น ซึ่งทั้งหมดเป็นแบคทีเรียอิมยีสต์ยีสต์จำนวนของยีสต์เหล่านี้ไม่แน่นอนขึ้นกับอายุของใบพืช, ชนิดของใบพืช, สารอาหาร, ความชื้น, การมีสารยับยั้ง และการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมบริเวณนั้นๆ แต่โดยเฉลี่ยแล้วมักจะพบยีสต์

ประมาณ 10^7 CFU ต่อกรัม น้ำหนักเปียกของตัวอย่างใบพืช ในขณะที่ราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) ที่พบบ่อยที่สุดคือ *Aureobasidium pullulans* (McCormack *et al.*, 1994; Inacio *et al.*, 2002; Glushakova *et al.*, 2006)

สำหรับตัวอย่างของยีสต์ที่เป็นเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์และแอสโคมัยซีตัสยีสต์ที่พบบนผิวใบพืชในประเทศต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของยีสต์ที่พบบนผิวใบพืชในประเทศต่างๆ

สปีชีส์	ชนิดของใบพืชที่พบ	ประเทศ	เอกสารอ้างอิง
เบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์			
<i>Cryptococcus amylolyticus</i>	<i>Cistus albidus</i>	โปรตุเกส	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>Cryptococcus cistialbidi</i>	<i>Cistus albidus</i>	โปรตุเกส	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>Cryptococcus tibetensis</i>	<i>Rhododendron triflorum</i> Hook. f.	จีน	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>Dioszegia athyri</i>	<i>Athyrium</i> sp.	จีน	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Dioszegia buhagiarii</i>	<i>Acer monspessulanum</i>	โปรตุเกส	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>Dioszegia butyracea</i>	<i>Betula ermanii</i> Cham.	จีน	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Dioszegia catarinonii</i>	<i>Acer monspessulanum</i>	โปรตุเกส	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>Dioszegia fristingensis</i>	<i>Arum maculatum</i>	เยอรมันนี	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>Dioszegia takashimae</i>	<i>Quercus faginea</i>	โปรตุเกส	Inacio <i>et al.</i> , 2005
<i>Dioszegia xingshanensis</i>	<i>Artemisia</i> sp.	จีน	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Pseudozyma graminicola</i>	<i>Phleum pretense</i>	รัสเซีย	Golubev <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	<i>Magnolia denudata</i> Desr.	จีน	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>Pseudozyma shanxiensis</i>	<i>Quercus mongolica</i> Fisch	จีน	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>Sporobolomyces blumeae</i>	<i>Blumea</i> sp.	ไทย	Takashima and Nakase, 2000
<i>Sporobolomyces fushanensis</i>	<i>Melastoma candidum</i> D. Don.	ไต้หวัน	Nakase <i>et al.</i> , 2005

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สปีชีส์	ชนิดของใบพืชที่พบ	ประเทศ	เอกสารอ้างอิง
<i>Sporobolomyces nylandii</i>	<i>Oryza sativa</i> L.	ไทย	Takashima and Nakase, 2000
<i>Sporobolomyces poonsookiae</i>	<i>Mangifera indica</i> L.	ไทย	Takashima and Nakase, 2000
<i>Sporobolomyces vermiculatus</i>	<i>Pennisetum pediocellatum</i>	ไทย	Takashima and Nakase, 2000
แอสโคไมยซีต์ยีสต์			
<i>Candida aechmeae</i>	ใบสับปะรดสี (bromeliads)	บราซิล	Landell <i>et al.</i> , 2010
<i>Ogataea allantospora</i>	<i>Carpinus betulus</i>	ฮังการี	Peter <i>et al.</i> , 2007
<i>Ogataea cecidiorum</i>	ใบของต้นวิลโลว์ (willows)	รัสเซีย	Glushakova <i>et al.</i> , 2010
<i>Ogataea nitrataversa</i>	<i>Fagus sylvatica</i> (Fagaceae)	ฮังการี	Peter <i>et al.</i> , 2008
<i>Torulasporea maleeae</i>	<i>Rhizophora stylosa</i>	ญี่ปุ่น	Limtong <i>et al.</i> , 2008b

ยีสต์ที่พบบนผิวใบพืชส่วนใหญ่ นอกจากจะมีประโยชน์ต่อการเจริญของพืชแล้วยังพบอีกว่า ยีสต์เหล่านี้บางสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ที่น่าสนใจที่ใช้ในอุตสาหกรรมได้อีกด้วย เช่น เอสเทอเรส (esterase), อะไมเลส (amylase), เคซีนเนส (caseinase) และเจลาตินเนส (gelatinase) และนอกจากนั้น ยังมีรายงานอีกว่า ทั้งยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่แยกได้จากผิวใบพืช เช่น *Aureobasidium pullulans*, *Citeromyces matritensis*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis* และ *Sporobolomyces roseus* มีความสามารถในการสร้างสารต่อต้านการเจริญของแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในคนได้ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างดินหรือจากตัวอย่างอื่นๆ ในสิ่งแวดล้อมแล้วพบว่า ยีสต์ที่แยกได้จากผิวใบพืชสามารถสร้างสารต่อต้านการเจริญของแบคทีเรียได้มากกว่า (McCormack *et al.*, 1994; Fonseca and Inacio, 2006; Mautone *et al.*, 2010)

2. เมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์

ยีสต์สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้เป็นอย่างดีในอาหารที่มีน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอนตั้งแต่สองอะตอมขึ้นไป เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แต่ นอกเหนือจากน้ำตาลยังมียีสต์บางชนิดที่สามารถเจริญได้บนอาหารที่มีเฉพาะสารประกอบที่มีคาร์บอนหนึ่งอะตอม โดยยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอม เช่น เมทานอล เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ เรียกว่า เมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์ (methylotrophic yeasts) ซึ่งยีสต์เหล่านี้อาจพบแพร่กระจายอยู่ในธรรมชาติได้ทั่วไป (Kurtzman and Fell, 1998; Barnett *et al.*, 2000)

Ogata *et al.* (1969) เป็นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่ค้นพบเมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์ โดย เมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์ที่คัดแยกได้คือ *Kloeckera* sp. 2201 (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Candida boidinii*) ซึ่งการค้นพบนี้ได้นำไปสู่การศึกษาอย่างกว้างขวางถึงวิธีการที่จะนำเมทานอลมาใช้ประโยชน์และการนำเมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์ไปใช้เพื่อการผลิตสารเมแทบอลิต์ (metabolite) ต่างๆ อาทิ กรดอะมิโน วิตามิน สารสี (pigment) พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) โคเอนไซม์ และเอนไซม์ เป็นต้น การแยกเมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์จากแหล่งธรรมชาตินั้น พบว่าประสบความสำเร็จน้อยกว่าการแยก เมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์ที่เรียกว่า enrichment technique ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณเซลล์ก่อน นำมาแยกเชื้อก็ตาม (การแยกเมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์ประสบความสำเร็จเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ จากกรณีศึกษา ขณะที่การแยกเมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์ที่เรียกประสบความสำเร็จถึง 90 เปอร์เซ็นต์ จากกรณีศึกษาทั้งหมด) (อ้างโดยศิริรัตน์, 2545) ทั้งนี้จะเนื่องมาจากในธรรมชาติมียีสต์ประเภทนี้ น้อย โดยในประเทศไทย Limtong *et al.* (2004) รายงานว่าจากตัวอย่างจำพวก ดอกไม้, ผลไม้, ยาง ไม้ และดิน 634 ตัวอย่าง แยกได้เมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์เพียง 253 สายพันธุ์ หรือประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่าง

van Dijken และ Harder (1974) แสดงการเพิ่มจำนวนและการแยกยีสต์ที่เจริญบนอาหารที่มี เมทานอล จากการทำ enrichment cultivation ตัวอย่าง 600 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับ pH ให้เป็นกรด และเติมสารปฏิชีวนะ เพื่อลดการเจริญของแบคทีเรียที่แข่งขันระหว่างขั้นตอนการแยก เชื้อ โดยพบ *Candida boidinii* และ *Pichia pinus* ที่แตกต่างกัน 36 สายพันธุ์ นอกจากนั้น พบว่ายีสต์ กลุ่มนี้มีความต้องการวิตามิน โดยเฉพาะไบโอตินและไทอามีน ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเมทา

นอลในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าอุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลการแยกเชื้อดีกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ของ van Dijken และ Harder แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สภาวะที่เหมาะสมในการแยกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ของ van Dijken และ Harder (1974)

Factors influencing enrichment	Optimum condition
pH value of medium	4.5 (the optimum pH for growth of yeasts on methanol is 5.0 to 6.0)
Antibiotics	Required in the physiological range of pH values for growth
Vitamin mixture	Necessary since most methanol-assimilating yeast require biotin and/or thiamin 0.1 to 0.5% (v/v).
Methanol concentration	At methanol concentrations above 0.5% inhibition of growth occurred in some species
Nature of the inoculum	Soil samples rich in organic matter were good sources

ในปี ค.ศ. 2004 และ 2005 Limtong *et al.* ได้รายงานการแยกและคัดเลือกลำโพงเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ทนอุณหภูมิสูงจากดอกไม้, ผลไม้, ยางไม้ และดิน โดยวิธี enrichment technique ในอาหารเหลว 1 เปอร์เซ็นต์ methanol-YNB (เมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์ในโตรเจนเบส 0.67 เปอร์เซ็นต์) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 4-5 วัน โดยทำ enrichment 3 รอบ จากนั้นนำอาหารที่ได้มาทำ cross streak ลงบนอาหารแข็ง 1 เปอร์เซ็นต์ methanol-YNB บ่มจนพบโคโลนีของยีสต์ เก็บเชื้อ และนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยทำ cross streak ลงบนอาหารแข็ง YM จากนั้นนำไปทดสอบการเจริญบนอาหารแข็ง 1% methanol-YNB ที่อุณหภูมิ 15 และ 37 องศาเซลเซียส โดยเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงต้องเจริญได้ในทั้งสองอุณหภูมิ

และในปี ค.ศ. 2008 Peter *et al.* ได้แยกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์จากตัวอย่างไม้ที่เน่าเปื่อย ดิน และใบพืช ที่เก็บในประเทศฮังการีในปี ค.ศ. 2005 และ 2006 โดยเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกที่สะอาด จากนั้นใช้ดิน 10 กรัม หรือ ใบพืช 3.5 กรัม มาแยกยีสต์โดยการทำ enrichment 2 รอบ ในอาหารยีสต์ในโตรเจนเบสที่เติมเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นเจือจางตัวอย่างให้เหมาะสมแล้วกระจายบนอาหารแข็ง Rose-Bengal Chloramphenicol (RBC)

Kurtzman and Robnett (2010) ได้รายงานไว้ว่า สำหรับสัดส่วนของปริมาณเมทิลโลโทรฟิเคียสต์เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ทั่วไปแล้ว แสดงให้เห็นว่า พบเมทิลโลโทรฟิเคียสต์เพียงจำนวนน้อยเท่านั้น และเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์พบว่า พบน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ทั้งหมดที่มีการอธิบายแล้ว โดยเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่พบอยู่ในสกุล *Ogataea*, *Komagataella*, *Kuraishia* และ *Candida* และในปัจจุบันสมาชิกของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์สกุล *Ogataea* เพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็วเหตุผลส่วนหนึ่งมาจากการเปลี่ยนยีสต์ที่เดิมอยู่ในสกุล *Pichia* แต่ยังคงรวมไปถึงการค้นพบเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ชนิดใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากภายในเวลาเพียงไม่กี่ปีอีกด้วย จนกระทั่งปัจจุบันนี้พบเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ในสกุลนี้แล้วมากกว่า 30 สปีชีส์ (Peter *et al.*, 2007; 2008; 2009; Limtong *et al.*, 2008a; Nagatsuka *et al.*, 2008; Glushakova *et al.*, 2010; Kurtzman and Robnett, 2010; Suh and Zhou, 2010)

ตัวอย่างของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่พบในหลากหลายแหล่ง แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เมทิล โลโทรฟิเคียสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างชนิดต่างๆ ในประเทศต่างๆ

สปีชีส์	ชนิดของตัวอย่าง	ประเทศ	เอกสารอ้างอิง
<i>Candida hungarica</i> ,	ไม้ที่เน่าเปื่อย	ฮังการี	Peter <i>et al.</i> , 2003
<i>Candida krabiensis</i>	ดิน	ไทย	Limtong <i>et al.</i> , 2004
<i>Candida rishirensis</i>	ดิน	ญี่ปุ่น	Nakase <i>et al.</i> , 2010
<i>Candida sithepensis</i>	ดิน	ไทย	Limtong <i>et al.</i> , 2004
<i>Candida suzukii</i>	เปลือกไม้	ไต้หวัน	Peter <i>et al.</i> , 2003
<i>Komagataella pseudopastoris</i>	ไม้ที่เน่าเปื่อย	ฮังการี	Dlauchy <i>et al.</i> , 2003
<i>Ogataea allantospora</i>	ใบ <i>Carpinus betulus</i>	ฮังการี	Peter <i>et al.</i> , 2007
<i>Ogataea cecidiorum</i>	ใบของต้นวิลโลว์ (willows)	รัสเซีย	Glushakova <i>et al.</i> , 2010
<i>Ogataea chonburiensis</i>	ดิน	ไทย	Limtong <i>et al.</i> , 2008
<i>Ogataea dorogensis</i>	ไม้ที่เน่าเปื่อย	ฮังการี	Peter <i>et al.</i> , 2003
<i>Ogataea falcaomoraisii</i>	สารที่หลั่งออกมาจากพืช	บราซิล, โคลอสตาริกา	Morais <i>et al.</i> , 2004

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สปีชีส์	ชนิดของตัวอย่าง	ประเทศ	เอกสารอ้างอิง
<i>Ogataea ganodermae</i>	แบสดีโอไมซีตของ <i>Ganoderma</i> sp.	จีน	Ji and Bai, 2008
<i>Ogataea nakhonphanomensis</i>	สารที่หลั่งออกมาจากฟืน	ไทย	Limtong <i>et al.</i> , 2008a
<i>Ogataea nitratoaversa</i>	ใบฟืน	ฮังการี	Peter <i>et al.</i> , 2008
<i>Ogataea paradorogensis</i>	รังของด้วงปีกแข็งชนิดหนึ่ง (galleries of ambrosia beetles)	ญี่ปุ่น	Nakase <i>et al.</i> , 2008
<i>Ogataea pilisensis</i>	ไม้ที่เน่าเปื่อย	ฮังการี	Peter <i>et al.</i> , 2003
<i>Ogataea siamensis</i>	ดอกไม้, สารที่หลั่งออกมาจาก ฟืน	ไทย	Limtong <i>et al.</i> , 2004
<i>Ogataea thermomethanolica</i>	ดิน	ไทย	Limtong <i>et al.</i> , 2005
<i>Ogataea polymorpha</i>	ดิน	เกาหลี	Shin <i>et al.</i> , 2001
<i>Ogataea trehaloabstinens</i>	สารที่หลั่งออกมาจากฟืน	ฮังการี	Peter <i>et al.</i> , 2003
<i>Ogataea zsoltii</i>	ไม้ที่เน่าเปื่อย	ฮังการี	Peter <i>et al.</i> , 2003

เหตุที่มีการศึกษาเมทิลโลโทรฟิคีสต์นั้น น่าจะเนื่องมาจากเมทิลโลโทรฟิคีสต์เป็น จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายด้าน เช่น สามารถใช้เป็นเจ้าบ้านที่ดีในการผลิตโปรตีน เซลล์เดี่ยว (single cell protein) ใช้ในการผลิตโปรตีนลูกผสม (recombinant protein production) เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาทางเทคโนโลยีชีวภาพ และสามารถนำไปใช้เป็น methanol-inducible promoters ได้ และโดยเฉพาะเมทิลโลโทรฟิคีสต์ *Ogataea polymorpha* และ *Komagataella pastoris* มีการนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์ต้นแบบในการศึกษาการสร้างและการทำลายของเพอรอกซิโซม (peroxisome biogenesis and degradation) และนำมาใช้ในการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน ได้ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการผลิตยา และยังพบอีกว่า *Ogataea polymorpha* มีความสามารถในการย่อยสลายเมทานอลและฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจมากในการนำไปใช้เพื่อการบำบัดของเสียและฟื้นฟูสภาพแวดล้อมโดยวิธีทางชีวภาพ โดยเฉพาะกับน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม (Hartner and Glieder, 2006; Kurtzman and Robnett, 2010; Negluta *et al.*, 2010a, 2010b)

3. การจัดจำแนกยีสต์

ตามกฎของอนุกรมวิธานยีสต์และราชนิดอื่นอยู่ภายใต้ International Code of Botanical Nomenclature (Kurtzman and Fell, 1998) อนุกรมวิธานของยีสต์เริ่มขึ้นในปี ค.ศ. 1838 เมื่อ Mayer ได้กำหนดชื่อสกุล *Saccharomyces* จากคำภาษากรีกว่า sakehar ซึ่งแปลว่าน้ำตาล และ Mayers ซึ่งหมายถึงรา Hansen เป็นคนแรกที่สร้างระบบสำหรับอนุกรมวิธานของยีสต์ โดยในปี ค.ศ. 1878 Hansen แสดงให้เห็นว่ายีสต์เป็นราที่มีการดำรงชีวิตส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยวและได้แยกเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1881 การจัดจำแนกยีสต์ในสมัยเริ่มแรกอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology), สรีรวิทยา (physiology) และคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemistry) ในการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลา ความถูกต้องแม่นยำ และความน่าเชื่อถือของผลที่ได้จากการทดสอบ บางครั้งการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างของลักษณะที่คล้ายคลึงกันได้ ทำให้เกิดปัญหาในการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (closely related species) เมื่อเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมีความก้าวหน้ามากขึ้น เช่น การพัฒนาเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ก็ได้เริ่มมีการกล่าวถึงการนำเกณฑ์ของอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomy) และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (molecular taxonomy) เช่น การศึกษาองค์ประกอบของเบสควีนินและไซโทซีน (G+C contents) การทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA hybridization) การหาลำดับของเบสใน rRNA gene ซึ่งใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่าวิธีการจัดจำแนกแบบดั้งเดิม จึงทำให้เทคนิคระดับโมเลกุลถูกนำมาในการจัดจำแนกชนิดของยีสต์มากขึ้น (สาวิตรี, 2549)

ปัจจุบันการจัดจำแนกยีสต์ใช้อนุกรมวิธานพอลิฟาซิก (polyphasic taxonomy) ซึ่งจัดจำแนกโดยใช้อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม อนุกรมวิธานเคมีและอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลร่วมกันช่วยให้สามารถจัดจำแนกยีสต์ได้ชัดเจนขึ้น (Kurtzman and Fell, 1998) โดยมีลักษณะต่างๆ ที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกยีสต์ตามที่สาวิตรี (2549) ได้รวบรวมไว้ ดังนี้

3.1 การจำแนกยีสต์โดยลักษณะแบบดั้งเดิม (Conventional characteristic)

ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกประเภทของยีสต์ ซึ่งรวบรวมโดย Kurtzman and Fell (1998) ประกอบด้วย

3.1.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

เป็นการศึกษาสัณฐานวิทยาของยีสต์ทั้งที่อยู่ในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยทั่วไปการจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกประเภทได้ในระดับสกุลหรือสูงกว่าสกุล ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดจำแนก ได้แก่ รูปร่างของเซลล์ การเจริญบนอาหารแข็งและอาหารเหลว การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม การสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศภายในเซลล์ (asexual endospore) การสร้างคลอมาสปอร์ (chlamydospore) การสร้างบอลลิสโตสปอร์ (ballistospore) การสร้างแอสโคสปอร์ การสร้างแบบลิดิโอสปอร์ และการตรวจหาเมตติ้งไทป์ (mating type)

3.1.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีมีความสำคัญในการจัดจำแนกยีสต์ในระดับสปีชีส์และสกุล แต่การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีนั้นไม่เน้นอนขึ้นอยู่กับเทคนิคและวิธีที่เลือกนำมาทดสอบ (Yarrow, 1998) ลักษณะทั่วไปที่นิยมใช้ในการจัดจำแนก ได้แก่ การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต การใช้สารประกอบคาร์บอน การใช้สารประกอบไนโตรเจน การเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามิน การเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์ และ 60 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิอื่นๆ การสร้างกรดจากการใช้กลูโคส การสร้างสารประกอบอมัยลอยด์ (amyloid) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease) การทนต่อไซโคลเฮกซิมิด (cycloheximide) การทดสอบปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี (diazonium blue B)

3.2 การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานเคมี

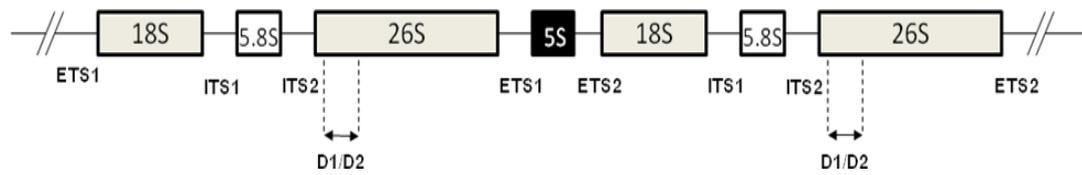
อนุกรมวิธานเคมี คือ การประเมินองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งมีชีวิต ทั้งสารเมแทบอลิต์ปฐมภูมิ (primary metabolites) และสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) รวมถึงกิจกรรมทางเคมี หรือสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ ได้แก่ ชนิดของโคเอนไซม์คิว (coenzyme Q) องค์ประกอบของผนังเซลล์ ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA hybridization) ปริมาณกวีนีนและไซโทซีน (G+C contents) ปกติการจัด

จำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานเคมีจะใช้ร่วมกับการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (Yamada, 1998)

3.3 การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลเป็นการศึกษาลักษณะทางยีนโนไทป์โดยตรง จึงไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเปลี่ยนสภาพแวดล้อมเช่นเดียวกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และอนุกรมวิธานเคมีซึ่งเป็นการตรวจลักษณะทางฟีโนไทป์ของยีสต์ การศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอยื่นอยู่บนหลักการพื้นฐานที่ว่า จีโนมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดประกอบด้วยบริเวณที่มีอัตราการวิวัฒนาการแตกต่างกันหลายบริเวณ และความแตกต่างนี้เองที่สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ ดังนั้นการเลือกบริเวณที่จะใช้ในการศึกษาระดับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจึงมีความสำคัญมาก บริเวณที่นิยมใช้ในการศึกษาได้แก่ ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของไรโบโซม (ribosomal DNA/RNA) ทั้งในหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (Large subunit, LSU) และหน่วยย่อยขนาดเล็ก (Small subunit, SSU) เนื่องจากไรโบโซมปรากฏอยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และมีจุดเริ่มต้นของวิวัฒนาการร่วมกัน มีหลายชุดในแต่ละเซลล์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน rDNA/rRNA gene มีทั้งส่วนที่มีวิวัฒนาการน้อยหรือบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และส่วนที่วิวัฒนาการมากหรือวิวัฒนาการเร็วที่เรียกว่า บริเวณผันแปร (variable region) หรือบริเวณอนุรักษ์น้อย (less conserved region) ทำให้สามารถเปรียบเทียบบริเวณอนุรักษ์เป็นจุดอ้างอิงเพื่อเทียบหาความแตกต่างของบริเวณผันแปรได้ (Valente *et al.*, 1999)

การศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของยีสต์นั้นนิยมศึกษา ยีนของอาร์เอ็นเอไรโบโซม (ribosomal RNA gene/ rRNA gene) (ภาพที่ 1) โดยให้ความสำคัญกับทั้งบริเวณที่มีการแสดงออก (coding region) คือ บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene มีความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ 18S rRNA gene มีความยาวประมาณ 1700 นิวคลีโอไทด์ และบริเวณที่ไม่มีการแสดงออก (non coding region) คือ internal transcribed spacer (ITS) ทั้ง ITS1 และ ITS2 ซึ่งมีความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (Scorzetti *et al.*, 2002) จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ D1/D2 ที่มีขนาด 600 นิวคลีโอไทด์อยู่ที่ปลายด้าน 5' ของ LSU rRNA gene ใน *Saccharomyces cerevisiae* คือนิวคลีโอไทด์ที่ 63-642 บนยีนของ rRNA เป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็วจึงเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างมากในบรรดาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LSU rRNA gene ความแตกต่างในบริเวณนี้เพียงพอที่จะแบ่งแยกสปีชีส์ของยีสต์ได้ (Kurtzman and Robnett, 1998)



ภาพที่ 1 แสดง rRNA genes ; 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene, LSU rRNA gene, ETS (external transcribed spacer) และ ITS (internal transcribed spacer)

ที่มา: สาวิตรี (2549)

Kurtzman and Robnett (1998) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ที่สร้างแอสโคสปอร์ 500 สปีชีส์ รวมทั้ง *Candida* และสกุลที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยนำบริเวณ D1/D2 มาเพิ่มจำนวนด้วย PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ NL1 (5-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3) และ NL4 (5-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3) โดยทำ PCR 36 รอบ ที่ 52 องศาเซลเซียส สำหรับ annealing และการขยายตัวยาวใช้ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และการทำให้เสียสภาพใช้ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gene clean II ลำดับของนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 สาย ของ rRNA gene โดย ABI Tag Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit แต่ละตัวอย่างทำปฏิกิริยาหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ 4 ปฏิกิริยา โดยไพรเมอร์ของปฏิกิริยาเหล่านี้ประกอบด้วยไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ NL2A (5-CTTGTTGCCTATCGGTCTC-3) และ NL3A (5-GAGACCGATAGCGAACAAAG-3) จากผลการวิเคราะห์ แสดงว่าสายพันธุ์ในสปีชีส์ส่วนใหญ่มีการผันแปร 0-2 นิวคลีโอไทด์ อย่างไรก็ตามมีสายพันธุ์ของ 3 สปีชีส์ ที่มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 3 นิวคลีโอไทด์ ส่วนสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *Metschnikowia agaves* แตกต่างกันถึง 5 นิวคลีโอไทด์ สำหรับ *Williopsis californica* ที่ตรวจสอบ 17 สายพันธุ์ มีความแตกต่าง 0-6 นิวคลีโอไทด์ แต่ 3 สายพันธุ์ที่มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 5-6 นิวคลีโอไทด์นั้นเป็นการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ที่ติดกัน (base contiguous deletion) มากกว่าการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (base substitution) นอกจากนี้ยังได้ทำการหาความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียส พบว่า คู่ของสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียสต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ มักจะมีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 3 นิวคลีโอไทด์ และจัดว่าเป็นคนละสปีชีส์ การผันแปรที่เห็นได้จากการเปรียบเทียบข้างต้นใช้ทำนายว่าถ้าสายพันธุ์มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ใน 600 นิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 คือ มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 6 นิวคลีโอไทด์ สายพันธุ์นั้นจะถูก

จัดเป็นคนละสปีชีส์ และสายพันธุ์ที่มีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์จัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน (conspecific species) หรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมากๆ (sister species)

จนถึงปัจจุบันมีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของ ยีสต์จำนวนหลายร้อยสายพันธุ์และมีการรวบรวมข้อมูลเหล่านี้ไว้ในคลังข้อมูลที่ International Nucleotide Sequence Database Collaboration ซึ่งประกอบไปด้วย DNA DataBank of Japan (DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>), European Molecular Biology Laboratory (EMBL: <http://www.emblheidelberg.de>) และ NIH genetic sequence database หรือ GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

4. สารส่งเสริมการเจริญของพืช

ฮอร์โมนพืช (phytohormones หรือ phytohormones หรือ plant hormones) เป็นสารอินทรีย์ ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญ เมแทบอลิซึม และการพัฒนาของพืช โดยชนิดของ ฮอร์โมนซึ่งเป็นที่ยอมรับมี 5 ชนิด คือ ออกซิน (auxin), กรดแอบไซซิก (abscissic acid), ไซโทไค นิน (cytokinin), จิบเบอเรลลิน (gibberellins) และเอทิลีน (ethylene) โดยฮอร์โมนชนิดต่างๆ นี้มี กระบวนการในการทำงานที่แตกต่างกันไป เช่น ควบคุมการแบ่งเซลล์ (cell division), การยืดยาว ของเซลล์ (cell elongation), การเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในกระบวนการเติบโต (differentiation), การสร้างส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์, การพักตัวของเมล็ด, การงอกของใบและ การควบคุมความแก่ของส่วนต่างๆ ของพืช ในต้นพืชมีระดับของฮอร์โมนเหล่านี้ต่ำมาก แต่ใน บรรดาฮอร์โมนทั้ง 5 ชนิดนี้ ออกซินเป็นฮอร์โมนที่ค้นพบเป็นชนิดแรก มีการศึกษากันอย่าง กว้างขวางและเป็นชนิดที่พบในปริมาณมากที่สุดอีกด้วย โดยเฉพาะในบริเวณใบอ่อน ลำต้น และเมล็ด โดยออกซินทำหน้าที่ในการส่งเสริมการเจริญของพืช โดยเพิ่มการยืดยาวของเซลล์ เพิ่ม การแบ่งเซลล์ และเพิ่มการเจริญเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในกระบวนการเติบโต โดยทั่วไปออกซิน ประกอบไปด้วยสารหลายชนิด เช่น กรดอินโดล-3-อะซิติก (indole-3-acetic acid, IAA), กรดอินโดล-3-บิวทีริก (indole-3-butyric acid, IBA), กรดอินโดล-3-โพรพิโอนิก (indole-3-propionic acid, IPA) และกรด-1-แนฟทาไลน์อะซิติก (1-Naphthaleneacetic acid, NAA) (Lu *et al.*, 2008) แต่กรดอินโดล-3-อะซิติก และกรดอินโดล-3-บิวทีริกเป็นสารที่พบเป็นหลักในปริมาณมากในพืชและยังพบ การสร้างโดยจุลินทรีย์อีกด้วย เช่น แบคทีเรีย, รา และสาหร่าย (Guo *et al.*, 2010; Shokri and Emtiazi, 2010)

จากงานวิจัยต่างๆ ที่ผ่านมามีพบว่า มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่แยกได้จากดิน ทั้งแบคทีเรีย รา เส้นใย และยีสต์มีความสามารถในการสร้างออกซิน ซึ่งมีผลต่อการเจริญและพัฒนาของพืช (Nassar *et al.*, 2005) สำหรับยีสต์พบว่ามีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาการผลิตออกซินไม่มากนัก เช่น Nassar *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการสร้างออกซินของยีสต์เอนโดไฟต์ *Cyberlindnera saturnus* ในรากข้าวโพด พบว่า *Cyberlindnera saturnus* สามารถสร้างออกซินเพื่อกระตุ้นการเจริญของต้นข้าวโพดได้ ในกรณีที่มีการเติมกรดอะมิโนแอล-ทริปโตเฟนลงไปด้วย เท่านั้น โดยพบปริมาณของกรดอินโดล-3-อะซิติลที่ที่ปลายรากและที่ปลายยอดเพิ่มขึ้นเป็น 14.35 และ 25.24 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ, Xin *et al.* (2009) ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติลของยีสต์เอนโดไฟต์ 3 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากต้น *Populus* พบว่า ยีสต์สายพันธุ์แรกจัดจำแนกเป็น *Rhodotorula graminis* ซึ่งมีความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติลได้สูงที่สุด คือ ประมาณ 39 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ จัดจำแนกได้เป็น *Rhodotorula mucilaginosa* ซึ่งพบว่า มีความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติลได้น้อยกว่าในสายพันธุ์แรก โดยสร้างได้ประมาณ 18 และ 8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์แห้ง ตามลำดับ และ El-Tarabily (2004) ได้ศึกษาความสามารถในการป้องกันการเกิดโรคในหัวบีทจากเชื้อก่อโรค *Rhizoctonia solani* AG-2-2 ภายใต้สภาวะเรือนกระจก และความสามารถในการสร้างสารสนับสนุนการเจริญของพืชโดยยีสต์ 3 สปีชีส์ที่แยกได้จากดินรอบรากหัวบีท คือ *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis* และ *Trichosporon asahii* โดยพบว่า ยีสต์ทั้ง 3 สปีชีส์ สามารถป้องกันการก่อโรคในหัวบีทได้ และยังสามารถสนับสนุนการเจริญของหัวบีทได้อีกด้วย โดยยีสต์ทั้ง 3 สปีชีส์สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติลได้ประมาณ 29.5, 24.1 และ 31.7 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร

สำหรับกลไกในการสังเคราะห์ออกซินนั้นมีการศึกษาพบว่า แอล-ทริปโตเฟน (L-Tryptophan) ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ออกซิน ซึ่งกลไกการสังเคราะห์ดังกล่าวนี้ พบได้ทั้งในพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์ ดังนั้นการเติมแอล-ทริปโตเฟนทำให้การสังเคราะห์ออกซินภายในหลอดทดลองทั้งโดยแบคทีเรียและราเส้นใยหลายชนิดเพิ่มขึ้น (Nassar *et al.*, 2005) แต่สำหรับยีสต์นั้นยังพบการศึกษาน้อยมาก จากการศึกษาของ Xin *et al.* (2009) กล่าวว่า แอล-ทริปโตเฟนเป็นกรดอะมิโนที่มีราคาแพงที่สุดชนิดหนึ่ง สำหรับการสังเคราะห์ต้องใช้พลังงานมาก ยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่จะสามารถสังเคราะห์แอล-ทริปโตเฟนได้ ในธรรมชาติยีสต์ที่จะผลิตแอล-ทริปโตเฟนได้ต้องขึ้นอยู่กับพืชที่เป็นโฮสต์ของยีสต์ชนิดนั้นๆ หรือจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกันในสิ่งแวดล้อม โดยจากการศึกษาของ Xin *et al.* (2009) ในครั้งนี้พบว่า แอล-ทริปโตเฟนเป็นกรด

อะมิโนที่พบในเนื้อเยื่อของต้น *Populus* ดังนั้นยีสต์ที่แยกได้จากต้นพืชชนิดนี้จึงไม่ต้องสังเคราะห์ แอล-ทริปโตเฟนเองและสามารถนำเอาแอล-ทริปโตเฟนจากพืชไปใช้เพื่อผลิตออกซินได้ทันที ส่วน พืชก็จะได้รับออกซินที่ผลิตจากยีสต์เป็นการตอบแทนเช่นกัน โดยยีสต์ที่แยกได้จากการทดลองครั้งนี้ คือ *Rhodotorula graminis* และ *Rhodotorula mucilaginosa*

ปัจจุบันทั่วโลกได้ให้ความสนใจในการใช้ประโยชน์จากปุ๋ยทางชีวภาพมากขึ้น เพื่อลดผลกระทบที่เกิดจากการใช้ปุ๋ยเคมีให้มากที่สุด โดยปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ คือ ความอุดมสมบูรณ์ของดิน ซึ่งจะพิจารณาจากความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตและปลดปล่อยสารเมแทบอลิต์หลายชนิดที่มีผลต่อการเจริญและความสมบูรณ์ของพืช (Young *et al.*, 2006) ปัจจุบันแม้ว่าจะมีรายงานว่า ยีสต์หลายสกุล เช่น *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis*, *Rh. graminis*, *Rh. mucilaginosa*, *Saccharomyces roseus*, *Trichosporon asahii* และ *Cyberlindnera saturnus* สามารถสังเคราะห์กรดอินโดล-3-อะซิติกได้ แต่ก็ยังมียีสต์จำพวกนี้น้อยมากที่สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยทางชีวภาพได้ (Nassar *et al.*, 2005)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกยีสต์จากตัวอย่างใบพืช

เก็บตัวอย่างใบพืชใส่ถุงพลาสติกที่สะอาดโดยไม่ให้มือเปล่าสัมผัสกับตัวอย่าง โดยบันทึกชนิดของพืช วันเดือนปีที่เก็บ สถานที่เก็บ และเก็บไว้ในที่เย็นจนกว่าจะนำมาแยกเชื้อตามวิธีการต่อไปนี้

1.1 การแยกยีสต์ทั่วไปจากผิวใบพืช

นำตัวอย่างใบพืชที่ตัดเป็นชิ้น (เพื่อให้มีขนาดเล็กพอที่จะใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร) ประมาณ 3 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลว yeast extract - malt extract (YM) ที่เติม คลอแรมฟินิคอล 0.02 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมโทรฟิโอะเนต 0.025 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator rotary shaker; IS-971R, lab. Companion, USA) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน จากนั้นนำ enrichment culture มาทำ cross streak บนอาหารแข็ง YM ที่เติม คลอแรมฟินิคอล 0.02 เปอร์เซ็นต์ และ โซเดียมโทรฟิโอะเนต 0.025 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส จนปรากฏโคโลนีของยีสต์ ตรวจสอบว่าใช่ยีสต์หรือไม่โดยนำมาทำ wet mount และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ นำโคโลนีของยีสต์มาทำ cross streak บนอาหารแข็ง YM เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้น เชื้อเชื้อบริสุทธิ์ลงบนอาหารแข็งเยือก YM เก็บไว้ที่ 4-8 องศาเซลเซียส และแช่ลงในอาหารเหลว YM ที่มีกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บในตู้แช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส (Limtong *et al.*, 2004)

1.2 การแยกเมทิลโลโทรฟิไคยีสต์จากผิวใบพืช

นำตัวอย่างใบพืชที่ตัดเป็นชิ้นประมาณ 3 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลว 0.5% methanol-yeast nitrogen base (YNB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 5 วัน นำ 1st enrichment culture ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในพลาสติกที่มีอาหารเหลว 0.5% methanol-YNB 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็วและอุณหภูมิเดียวกันกับที่ใช้ในการทำ enrichment ครั้งแรก เมื่อครบ 5 วัน นำ 2nd enrichment culture ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน

พลาสติกที่มีอาหารเหลว 0.5% methanol-YNB 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ โดยใช้ความเร็วและอุณหภูมิเช่นเดียวกันกับที่ใช้ในการทำ enrichment ครั้งแรก เมื่อครบ 5 วัน นำ 3rd enrichment culture มาทำ cross streak ลงบนอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส จนปรากฏโคโลนีของยีสต์ ตรวจสอบว่าใช่ยีสต์หรือไม่ นำมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ และเก็บเชื้อเช่นเดียวกับการแยกยีสต์ทั่วไป

2. การทดสอบการเจริญของเมทิลโลโทรฟิกลีคยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ

นำเมทิลโลโทรฟิกลีคยีสต์ที่แยกได้เพาะลงบนอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB แบบลากให้เป็นเส้นตรง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15, 25 และ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลการเจริญทุกวันจนครบ 7 วันในการทดลองใช้ยีสต์สายพันธุ์ S051 คือ *Ogataea nakonphanomensis* ซึ่งเป็นเมทิลโลโทรฟิกลีคยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant methylotrophic yeast) (Limtong *et al.*, 2008a) เป็น positive control พร้อมกับเทียบการเจริญกับการเจริญบนอาหารแข็ง YM

3. การจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิกลีคยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ large subunit rRNA gene และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

(1) การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

การสกัดดีเอ็นเอยีสต์ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Lachance *et al.* (1999) ที่อ้างถึงโดย ชนิตา (2552) ดังนี้

เลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็ง YM อายุไม่เกิน 48 ชั่วโมง แล้วเตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำรีเวิร์สออสโมซิสปริมาณ 50 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปใส่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเดือดอุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และนำไปแช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที อีกครั้งหนึ่ง ตกตะกอนเซลล์โดยการเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนใสที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่ในหลอดไมโครทิวบ์หลอดใหม่ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

(2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene โดยใช้เทคนิค

Polymerase Chain Reaction (PCR)

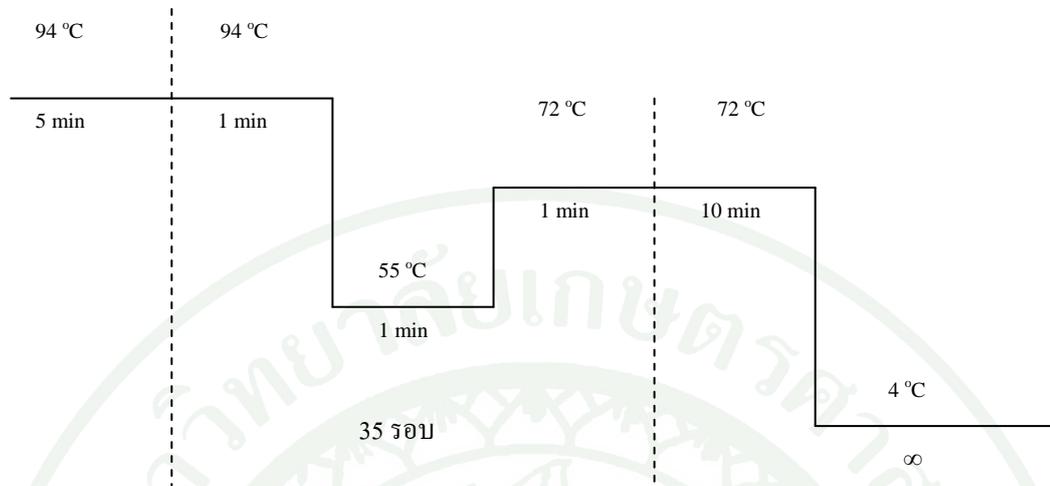
เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene โดยใช้ NL1 (5'-GCATAT CAATAAGCGGAGGAAAAG-3') เป็น forward primer และ NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAA GACGG-3') เป็น reverse primer ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Kurtzman และ Robnett (1998) โดยเตรียม PCR reaction mixture ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตามวิธีดังนี้

10X PCR buffer	1	ไมโครลิตร
MgCl ₂ (25 mM)	0.8	ไมโครลิตร
dNTP (2.5 mM)	0.8	ไมโครลิตร
Primer NL1 (10 pmol)	0.3	ไมโครลิตร
Primer NL4 (10 pmol)	0.3	ไมโครลิตร
Taq polymerase (Fermentas; 5U/ μ l)	0.05	ไมโครลิตร
DNA template	1	ไมโครลิตร
Sterile reverse osmosis water	5.75	ไมโครลิตร
Total volume	10	ไมโครลิตร

นำหลอดไมโครทิวป์ที่มี PCR reaction mixture ที่ผสมแล้วใส่ในเครื่อง PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) โดยใช้โปรแกรมการเพิ่มลดอุณหภูมิ ดังนี้

- 1) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
- 2) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (เป็นขั้นตอนที่คู่ของดีเอ็นเอแยกออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว)
- 3) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงมาเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับ DNA template ที่ complementary กันได้)
- 4) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (เป็นขั้นตอนที่เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์)
- 5) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- 6) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบ

ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 35 รอบ



จากนั้นทำการตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที นำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมด้วยเอทิลเบรียมโบรไมด์ แล้วส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV transilluminator (Bioinstrument – ATTO, Yamato, Japan) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) (Bioinstrument – ATTO, Yamato, Japan) แล้ว PCR product ที่ได้ควรมีขนาดประมาณ 500 – 600 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene

(3) การทำให้ PCR product บริสุทธิ์

ทำให้ PCR product บริสุทธิ์ใช้ QIA quick PCR purification Kit (Bioinstrument – ATTO, Yamato, Japan) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตดังนี้

เติม PB buffer ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร PCR product ลงใน QIA quick column ดูด PCR product ที่เหลือทั้งหมดใส่ลงในคอลัมน์ เหย็งที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทของเหลวทิ้งไป แล้วเติม PE buffer ที่ผสมเอทานอล 750 ไมโครลิตร เหย็งที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทของเหลวทิ้งไป เหย็งอีกครั้งที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่ค้างอยู่ในคอลัมน์ นำหลอดคอลัมน์ที่มีแผ่นกรองมาใส่ลงในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติมน้ำรีเวิร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปบนแผ่นกรอง 15 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเหย็งที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ก็จะได้ดีเอ็นเอ

บริสุทธิ์ ทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

(4) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยใช้ไพรเมอร์ NL1 และ NL4

(5) การจัดจำแนกยีสต์โดยเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ large subunit rRNA gene

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ชนิดต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) โดยใช้โปรแกรม BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) และใช้เกณฑ์ของ Kurtzman และ Robnett (1998) ในการระบุยีสต์ว่าเป็นยีสต์ที่อธิบายแล้วหรือเป็นยีสต์ที่ยังไม่เคยมีรายงาน (ยีสต์สปีชีส์ใหม่) โดยพิจารณาว่าถ้า 2 สายพันธุ์มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (คือมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 6 นิวคลีโอไทด์) สายพันธุ์ทั้งสองนั้นจัดจำแนกได้เป็นคนละสปีชีส์ และถ้ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์ อาจจัดจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกัน (conspecific species) หรือเป็นสปีชีส์ที่สัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (sister species)

(6) การสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ระหว่างยีสต์สปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกัน โดยใช้ multiple alignment program CLUSTAL X ver. 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) จากนั้นสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) คำนวณค่า evolutionary distance โดย two-parameter ของ Kimura (1980) และประเมินค่าความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985)

การศึกษาลักษณะยีสต์สปีชีส์ใหม่ตามเกณฑ์ที่ใช้สำหรับอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและ อนุกรมวิธานเคมี

เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับ โมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ นำยีสต์ที่พบว่าเป็น สปีชีส์ใหม่มาศึกษาลักษณะต่างๆ ตามเกณฑ์ที่ใช้สำหรับอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม ซึ่งประกอบด้วย การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี และอนุกรมวิธานเคมี ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาตามวิธีของ Yarrow (1998) ในหนังสือ The Yeast, A Taxonomic Study, 4th edition ซึ่งได้แก่ สัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว ลักษณะการ เจริญบนอาหารแข็ง การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ และการสร้างแอสโคสปอร์

4.1.1 สัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลวทำโดยการเพาะยีสต์ที่มี อายุ 24-48 ชั่วโมง ในอาหารเหลว YM บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของ เซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกรูปร่าง กลไกการเพิ่มจำนวนแบบไม้อาศัยเพศ การจัดเรียงตัว ของเซลล์ (เดี่ยว, คู่ หรืออยู่เป็นกลุ่มใหญ่) ขนาดของเซลล์ รวมทั้งสังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อ (culture characteristic) ในอาหารเหลว เช่น เชื้อลอยเป็นฝ้าที่ผิวหน้า (pellicle) หรือจับกลุ่มกันเป็น ก้อนเล็กๆ ตกตะกอน (flocculent) หรือเป็นเมือกตกตะกอน (mucoïd sediment) หรือเป็นวงแหวนที่ ขอบหลอด (ring) หรือเกาะกันเป็นก้อนเหนียว (coherent) หรือเกาะกันแน่นแข็ง (compact)

4.1.2 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง

เพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง YM และบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 1-7 วัน ตรวจสอบสัณฐานวิทยาของยีสต์บนอาหารแข็ง YM โดยสังเกตสีเนื้อ (texture) ผิวหน้า ความนูน และขอบของโคโลนี

4.1.3 การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ตรวจสอบโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง corn meal หรืออาหารแข็ง potato dextrose ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ (slide culture) โดยนำสไลด์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อจุ่มลงไป ในอาหารแข็งที่หลอมเหลวในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว นำสไลด์ที่อาหารแข็งตัวแล้วไปวางบนแท่งแก้วรูปตัวยูในจานเพาะเชื้อ เพาะเชื้อบางๆ โดยการเจียนอาหารแข็ง 1-2 เส้น ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ทำให้ปราศจากเชื้อ โดยการจุ่มแอลกอฮอล์ ลนไฟ เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงในจานเพาะเชื้อที่วางสไลด์เพื่อให้ความชื้นป้องกันวุ้นบนสไลด์แห้ง บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก 3 วัน

4.1.4 การสร้างแอสโคสปอร์

เพาะยีสต์บนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็งสำหรับการสร้างสปอร์ เช่น YM, acetate, malt extract, corn meal และ Gorodkova บ่มที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการสร้างแอสโคสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากบ่มเป็นเวลา 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยรายงานรูปร่าง สี และจำนวนของแอสโคสปอร์ ตลอดจนรูปร่าง สี และความคงทนของแอสคัส

4.2 ลักษณะสรีรวิทยาและชีวเคมี

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่มีความสำคัญสำหรับการจำแนกประเภทยีสต์ในระดับสปีชีส์และใช้ประจำในการจัดจำแนกยีสต์ ดังนี้

4.2.1 การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนเป็นการทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้สารประกอบคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญแบบใช้ออกซิเจน เป็นการทดสอบที่ใช้สำหรับการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ การแอสซิมิเลตสารประกอบบางชนิด เช่น ดี-ไซโลส, กรด ดี-กลูโคโรนิกและอินอซิทอลสามารถใช้เพื่อแยกสกุลของยีสต์ได้ การทดสอบการแอสซิมิเลต

สารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลวทำตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยใช้สารประกอบคาร์บอนจำนวน 40 ชนิด ดังนี้

เฮกโซส	ดี-กลูโคส, กาแลกโทสและซอร์โบส
ไดแซ็กคาไรด์	เซลโลไบโอส, แลกโทส, มอลโทส, เมลลิไบโอส, ซูโครส และทรีฮาโลส
ไตรแซ็กคาไรด์	เมลลิซิโทส และราฟฟิโนส
โพลีแซ็กคาไรด์	อินูลิน และแป้ง
เพนโทส	ดี-อะราบิโนส, แอล-อะราบิโนส, ดี-ไรโบส, แอล-แรมโนส และดี-ไซโลส
แอลกอฮอล์	กาแลกทิทอล, อิริทริทอล, ดี-กลูซิทอล, อินอซิทอล, ดี-แมนนิทอล, กลีเซอรอล, ไรบิทอล, เอทานอล และเมทานอล
กรดอินทรีย์	กรดซิตริก, กรดแลกติก, กรดซัคซินิก, กรดดี-กลูโคนิก, กรดดี-กลูโคโรนิก และกรดกาแลกทูโรนิก
ไกลโคไซด์	แอลฟามะทิล-ดี-กลูโคไซด์และซาลิซิน
สารประกอบอื่น	เอ็นอะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน และดี-กลูโคโน-5-แลกโทน

บางครั้งอาจต้องเพิ่มการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบบางอย่างเพื่อแยกแยะระหว่างสปีชีส์ของยีสต์บางสกุล สารประกอบเหล่านั้น คือ 2-คีโต-ดี-กลูโคเนต และ 5-คีโต-ดี-กลูโคเนต

การทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลวใช้อาหารในโตรเจนเบสที่ไม่เติมสารประกอบคาร์บอนเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (negative control) และใช้อาหารในโตรเจนเบสที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก (positive control)

เตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง โดยใช้ลูปถ่ายเชื้อลงไปในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร ความขุ่นของยีสต์ที่เตรียมได้นั้นประเมินโดยใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปทาบกับหลอดที่บรรจุเซลล์ยีสต์แขวนลอย ความขุ่นของยีสต์ที่ใช้สำหรับเป็นกล้าเชื้อเท่ากับความขุ่นที่มองผ่านหลอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยแล้วเห็นเส้นเป็นแถบสีดำพura (ซึ่งเท่ากับ 1+ เมื่ออ่านผลการเจริญ)

จากนั้นเพาะเชื้อโดยใช้พาสเจอร์ปีเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยลงในอาหารทดสอบที่มีสารประกอบคาร์บอนชนิดต่างๆ จำนวน 1 หยด บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลทุกสัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ โดยตรวจวัดระดับการเจริญซึ่งทำโดยใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร เช่นเดียวกับที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอย ทาบหลอดลงด้านหน้าเส้น มองผ่านหลอดเฉียงเชื้อแล้วสังเกตเส้นสีดำ ดังนี้ +++ คือ การเจริญของเชื้อที่มีความขุ่นซึ่งจะลบเส้นสีดำอย่างสมบูรณ์, ++ เห็นเส้นพร่า, + เห็นเส้นแต่ขอบเห็นไม่ชัด และ - คือ เห็นเส้นและขอบชัดเจน จากนั้นทำการรายงานผลดังรายละเอียดต่อไปนี้

+	=	มีการเจริญ (positive) โดยอ่านผลเป็น ++ หรือ +++ ในสัปดาห์ที่ 1 หรือสัปดาห์ที่ 2
l	=	มีการเจริญล่าช้า (delayed positive, latent) โดยอ่านผลเป็น ++ หรือ +++ อย่างรวดเร็ว แต่หลังจาก 2 สัปดาห์ หรือ นานกว่า
s	=	มีการเจริญช้า (slow positive) โดยอ่านผลเป็น ++ หรือ +++ ช้าๆ ในระยะเวลาที่นานกว่า 2 สัปดาห์
w	=	มีการเจริญน้อย (weak positive) โดย อ่านผลเป็น +
-	=	ไม่มีการเจริญ อ่านผลเป็น -
(+)	=	ไม่ค่อยพบการเจริญ (seldom positive)
V	=	ผันแปร (variable) คือ บางสายพันธุ์มีการเจริญและบางสายพันธุ์ไม่มีการเจริญ
+/w	=	มีการเจริญหรือเจริญน้อย คือ ทุกสายพันธุ์เจริญแต่บางสายพันธุ์เจริญน้อย
w/-	=	มีการเจริญน้อยหรือไม่เจริญ

4.2.2 การหมักคาร์โบไฮเดรต

การหมักหมายถึงการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งยีสต์มีความสามารถในการหมักน้ำตาลต่างๆ กัน โดยทั่วไปน้ำตาลที่ใช้ตรวจสอบความสามารถในการหมักของยีสต์ คือ ดี-กลูโคส ดี-กาแลกโทส มอลโทส ซูโครส ทรีฮาโลส แล็กโทส ราฟไฟโนส และเมลลิไบโอส โดยทดสอบการหมักน้ำตาลตามวิธีของ Yarrow (1998) วิธีทดสอบทำโดยเตรียมอาหารสำหรับทดสอบการหมักน้ำตาล (fermentation basal medium) ใส่ลงในหลอดทดสอบซึ่งภายในบรรจุหลอดดักแก๊ส (durham

tube) หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทำการเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ยกเว้นราฟิโนสใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด เตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง โดยใช้ลูปถ่ายเชื้อลงไปใต้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร ความขุ่นของยีสต์ที่เตรียมได้นั้นประเมินโดยการใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปทาบบกับหลอดที่บรรจุเซลล์ยีสต์แขวนลอย ความขุ่นของยีสต์ที่ใช้สำหรับเป็นกล้าเชื้อเท่ากับความขุ่นที่มองผ่านหลอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยแล้วเห็นเส้นเป็นแถบสีดำพร่า (ซึ่งเท่ากับ 1+ เมื่ออ่านผลการเจริญ) เพาะยีสต์โดยใช้พาสเจอร์บีเปิดที่ผ่านการฆ่าเชื้อหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยลงในอาหารทดสอบที่มีสารประกอบคาร์บอนชนิดต่างๆ จำนวน 1 หยด บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลการหมักโดยสังเกตปริมาณแก๊สที่สะสมในหลอดดักแก๊ส และการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารทุกวันจนครบ 7 วัน จากนั้นตรวจสอบทุกสัปดาห์จนครบ 28 วัน ผลการหมักรายงานโดยอาศัยเวลาที่ใช้ในการสร้างแก๊สให้เต็มหลอดดักแก๊ส และปริมาณที่สะสมแก๊สไว้ในหลอดดักแก๊ส ดังนี้

- + = มีการหมักรุนแรง (strong positive) คือ มีแก๊สเต็มหลอดดักแก๊สภายใน 7 วัน
- l = การหมักเกิดล่าช้า (delayed positive หรือ latent positive) คือ มีแก๊สเต็มหลอดดักแก๊สอย่างรวดเร็ว แต่การหมักเกิดหลังจากบ่มนานกว่า 7 วัน
- s = การหมักเกิดช้าๆ (slowly positive) คือ แก๊สค่อยๆ เข้าไปจนเต็มหลอดดักแก๊ส หลังจากบ่มนานกว่า 7 วัน
- w = การหมักอ่อน (weak positive) คือ มีแก๊สไม่เต็มหลอดดักแก๊ส (มีแก๊สน้อยกว่าหนึ่งในสามของหลอด ในขณะที่ถ้ามีแก๊สมากกว่าหนึ่งในสามของหลอดจัดว่าเป็นบวก)
- = ไม่มีการหมัก คือ ไม่มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส
- v = บางสายพันธุ์หมักน้ำตาลได้ บางสายพันธุ์ไม่หมัก

4.2.3 การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนศึกษาบนอาหารแข็งโดยใช้ starved inoculum ตามวิธีของ Nakase and Suzuki (1986) สารประกอบไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษาการแอสซิมิเลตมี 6 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) โพแทสเซียมไนเตรต (potassium nitrate) โซเดียมไนไตรต์ (sodium nitrite) เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์ (ethylamine hydrochloride) แอล-ไลซีน (L-lysine) และคาดาเวอรินไดไฮโดรคลอไรด์ (cadaverine dihydrochloride)

ศึกษาการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนโดยเฉพาะยีสต์บนอาหารแข็ง YM เพื่อเป็นกล้าเชื้อ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อจำนวนน้อยๆ ลงในอาหารเหลว Yeast Carbon Base (YCB) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้ยีสต์ใช้ในโตรเจนที่สะสมไว้ภายในเซลล์ออกให้หมด จากนั้นใช้พาสเจอร์ปีเปตหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอย 1 หยดลงบนจานอาหารแข็ง YCB ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในการทดลองใช้อาหารแข็ง YCB ที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ และอาหารแข็ง YCB ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก เนื่องจากยีสต์ทุกชนิดใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ตรวจสอบโดยสังเกตการเจริญของยีสต์ทุก 2-4 วัน จนครบ 28 วัน

4.2.4 การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ (amyloid) ภายนอกเซลล์

การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์จะตรวจสอบตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยตรวจภายหลังการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน และสารประกอบไนโตรเจนเสร็จเรียบร้อยแล้ว โดยหยด Lugol's solution ลงในหลอดทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และบนจานอาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือสีน้ำเงินแกมเขียว แสดงว่ามีการสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์

4.2.5 การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน

การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามินจะทำการทดสอบตามวิธีของ Komagata and Nakase (1967) โดยเพาะยีสต์บนอาหารแข็ง YM บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน ถ่ายเชื้อปริมาณน้อยๆ ลงในอาหารที่ปราศจากวิตามิน (vitamin free medium) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อให้ยีสต์ใช้วิตามินที่สะสมภายในเซลล์ออกให้หมด จากนั้นทำการถ่ายเชื้อปริมาณน้อยๆ ลงในอาหารที่ปราศจากวิตามินหลอดใหม่ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบโดยสังเกตการเจริญของเชื้อทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

4.2.6 การสร้างกรดจากกลูโคส

การสร้างกรดจากกลูโคสสามารถตรวจสอบได้ตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ใน Custer's chalk medium บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจสอบผลทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยสังเกตการเกิดโซนาในสบริเวณรอบๆ เชื้อ

4.2.7 ความต้านทานไซโคลเฮกซีไมด์

ตรวจสอบความต้านทานไซโคลเฮกซีไมด์ตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยทดสอบในอาหารเหลวที่มีแบคทีเรีย-ยีสต์ในโตรเจนเบส และ ดี-กลูโคส ที่มีการเติมไซโคลเฮกซีไมด์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ส่วนต่อล้านส่วน และ 1,000 ส่วนต่อล้านส่วน เพาะยีสต์ลงในอาหารทดสอบ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจสอบผลทุก 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยสังเกตการเจริญของยีสต์และรายงานผลเช่นเดียวกับการทดสอบการแออสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

4.2.8 การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง

ตรวจสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงหรือเกลือความเข้มข้นสูงตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมงลงบนอาหารแข็ง 4 ชนิด คือ อาหารแข็งที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์กับโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์

บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของยีสต์บนอาหารแข็งทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

4.2.9 การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

ตรวจสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเฉพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมงในอาหารเหลว YM และบ่มในตู้บ่ม (incubator) ที่ 20, 25, 37 และ 42 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน ตรวจสอบผลทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยดูการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกับการตรวจสอบการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

4.2.10 การไฮโดรไลซ์ยูเรีย

ตรวจการไฮโดรไลซ์ยูเรียตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเฉพาะยีสต์ที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบนอาหารแข็ง Christensen's urea บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน ถ้ามีการไฮโดรไลซ์ยูเรียความเป็นด่างที่เพิ่มขึ้นจะเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นสีชมพูแดง ในการทดสอบการไฮโดรไลซ์ยูเรียใช้ยีสต์ในสกุล *Rhodotorula* เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก

4.2.11 การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี

ทดสอบการทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบีนบนอาหารแข็งตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็ง YM บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปบ่มต่อที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดปล่อยให้เย็นจนเท่าอุณหภูมิห้อง หยด DBB reagent ลงที่ผิวหน้าโคโลนี ถ้าเกิดสีแดงเข้มจนถึงสีม่วงภายในเวลา 1-2 นาที ที่อุณหภูมิห้องแสดงว่าผลเป็นบวก

4.3 การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (การวิเคราะห์ยูบิควิโนน)

ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมีที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้คือ การศึกษาชนิดโคเอนไซม์คิว (coenzyme Q) หรือยูบิควิโนน (ubiquinone) ซึ่งเป็นไอโซพรีนอยด์ยูบิควิโนนที่มีความสำคัญใน

กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในการหายใจของยีสต์ การวิเคราะห์ยูบิควิโนนทำตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Yamada and Kondo (1973)

4.3.1 การเตรียมเซลล์

เพาะยีสต์ในอาหารเหลว yeast extract peptone dextrose (YPD) (ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์, เปปโตน 2 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 3 วัน เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เตรียมเป็นสารแขวนลอยเซลล์ โดยเติมน้ำกลั่น 12.5 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเทใส่พลาสติกก้นกลม (round bottom flask) เพื่อเตรียมสกัดยูบิควิโนนในขั้นตอนถัดไป

4.3.2 การสกัดยูบิควิโนนจากเซลล์ยีสต์

เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 6 กรัม ลงในพลาสติกก้นกลมที่มีสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมไพโรแกลลอล (pyrogallol) 1.5 กรัม และเมทานอลปริมาตร 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึง refluxed ด้วยน้ำเย็นนาน 30 นาที ใน heating mantle โดยใส่ glass bead ลงไปในระหว่างการต้มเพื่อป้องกันการเดือดรุนแรง เมื่อ refluxed เสร็จแล้ว ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมเฮกเซน (hexane) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เขย่าให้เฮกเซนผสมกับเมทานอล เพื่อดึงยูบิควิโนนที่อยู่ในเมทานอลให้อยู่ในเฮกเซน ถ่ายใส่กรวยแยก (separating funnel) เขย่าให้เข้ากัน ระหว่างเขย่าให้เปิดจุกเพื่อปล่อยอากาศที่อยู่ภายในกรวยแยกออก เก็บสารละลายในส่วนของเฮกเซนซึ่งอยู่ชั้นบนสุด ปล่อยให้ชั้นเมทานอลที่มีตะกอนดำของไพโรแกลลอลและชั้นของน้ำทิ้งไป ล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2-3 ครั้ง ถ่ายสารละลายเฮกเซนใส่ในบีกเกอร์ และเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัสลงไป ปริมาณน้อยๆ เพื่อดึงน้ำออก ถ่ายสารละลายลงในพลาสติกสำหรับระเหย (evaporating flask) ทำการระเหยเฮกเซนออกที่ 40 องศาเซลเซียส และละลายด้วยอะซิโตน 0.5 มิลลิลิตร

4.3.3 การทำให้ยูบิควิโนนบริสุทธิ์

เตรียมสารประกอบยูบิควิโนนให้บริสุทธิ์ด้วยการทำ Thin layer chromatography (TLC) บนแผ่นซิลิกาเจล (silica gel F254 TLC plate) โดยใช้เฮกเซน และ

ไดเอทิลอีเทอร์ (diethyl ether) ในอัตราส่วน 85 ต่อ 15 เป็น mobile phase ยูบิควิโนนจะปรากฏเป็นแถบสีเหลืองที่มีค่า Rf ประมาณ 0.21 ตรวจสอบแถบของยูบิควิโนนอีกครั้งภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ยูบิควิโนนจะปรากฏเป็นแถบสีเหลือง จุดแถบสีเหลืองที่ปรากฏบนแผ่น TLC และสกัดด้วยอะซิโตน 1 มิลลิลิตร กรองสารละลายด้วยแผ่นกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้นโดยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน

4.3.4 การวิเคราะห์ชนิดของยูบิควิโนนด้วย HPLC

วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบยูบิควิโนนด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent 1100, USA) โดยใช้คอลัมน์ Cosmosil 5C18 (Nacalai tesque, Japan) และใช้เมทานอล และไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol) ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 เป็น mobile phase อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร จำแนกชนิดของยูบิควิโนนที่วิเคราะห์โดยเทียบกับยูบิควิโนนมาตรฐาน

5. การตรวจความสามารถของยีสต์ในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิก

5.1 การสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในหลอดทดลอง

ตรวจความสามารถของยีสต์ในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิก ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Xin *et al.* (2009) โดยการเพาะเลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็ง YM บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YPD ที่เติมแอล-ทริปโตเฟน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน จากนั้นนำอาหารเหลวที่มีการเจริญของยีสต์ 1 มิลลิลิตร มาเก็บตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนของเหลวใสเหนือตะกอน 0.5 มิลลิลิตร ไปผสมกับ Salkowski reagent (เฟอร์ริก-3-คลอไรด์ (FeCl₃) 12 กรัมต่อลิตร และกรดซัลฟิวริก (H₂SO₄) 7.9 โมลาร์) (Glickmann and Dessaux, 1994) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร หากมีการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิก สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูหลังจากทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (PharmaSpec UV-1700, Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร จากนั้นเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของกรด

อิน โคล-3-อะซีติกกับกราฟมาตรฐาน ส่วนตะกอนเซลล์นำไปทำให้แห้ง โดยอบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน แล้วจึงนำไปชั่งน้ำหนักแห้ง

5.2 การสร้างกรดอิน โคล-3-อะซีติกเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในฟลาस्क

การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอิน โคล-3-อะซีติกเมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาस्क โดยการเพาะเลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็ง YM บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YPD ที่เติมแอล-ทริปโตเฟน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบการสร้างกรดอิน โคล-3-อะซีติก ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Xin *et al.* (2009) เช่นเดียวกันกับในขั้นตอนการตรวจการสร้างกรดอิน โคล-3-อะซีติกเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในหลอดทดลอง

ผลและวิจารณ์

1. ผลการเก็บตัวอย่างและการแยกยีสต์จากตัวอย่างใบพืช

เก็บตัวอย่างใบพืชชนิดต่างๆ ได้รวม 97 ตัวอย่าง ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 4 จากพื้นที่ต่างๆ 20 แห่ง ใน 7 จังหวัด ได้แก่

1. ค่ายลูกเสือชिरารุช อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี จำนวน 19 ตัวอย่าง
2. สำนักงานการท่องเที่ยวโรงเรียน จปร. จ.นครนายก จำนวน 7 ตัวอย่าง
3. อ่างเก็บน้ำคลองโบริด จ.นครนายก จำนวน 3 ตัวอย่าง
4. เขื่อนขุนด่านปราการชล จ.นครนายก จำนวน 3 ตัวอย่าง
5. อ่างเก็บน้ำจักรพงษ์ จ.ปราจีนบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง
6. เขาค้อได้ จ.ปราจีนบุรี จำนวน 2 ตัวอย่าง
7. อุทยานกบินทร์เฉลิมราชย์ จ.ปราจีนบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง
8. โครงการขุดลอกหนองสระหิน จ.สระแก้ว จำนวน 1 ตัวอย่าง
9. อ่างเก็บน้ำบ้านห้วยชัน จ.สระแก้ว จำนวน 3 ตัวอย่าง
10. อ่างเก็บน้ำพระปรัง จ.สระแก้ว จำนวน 6 ตัวอย่าง
11. อ่างเก็บน้ำห้วยยาง จ.สระแก้ว จำนวน 4 ตัวอย่าง
12. แหล่งน้ำเพื่อการดับเพลิง จ.บุรีรัมย์ จำนวน 4 ตัวอย่าง
13. วัดห้วยมงคล อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 2 ตัวอย่าง
14. บ้านทุ่งเลื่อนอน อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 2 ตัวอย่าง
15. อ.เมืองชุมพร จ.ชุมพร จำนวน 1 ตัวอย่าง
16. ปากน้ำชุมพร จ.ชุมพร จำนวน 2 ตัวอย่าง
17. อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร จำนวน 1 ตัวอย่าง
18. เกาะมาตรา จ.ชุมพร จำนวน 22 ตัวอย่าง
19. ทางหลวงชนบท กม. 7 อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร จำนวน 4 ตัวอย่าง
20. วัดทางสาย อ.บางสะพาน จ.ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 1 ตัวอย่าง

1.1 ผลการแยกยีสต์ทั่วไปจากผิวใบพืช

เมื่อนำตัวอย่างมาแยกยีสต์ทั่วไปโดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนและอาศัยความแตกต่างของโคโลนีที่ปรากฏ พบว่าจากตัวอย่างใบพืชทั้งหมด 97 ตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์ทั่วไปได้ 128 สายพันธุ์ จาก 90 ตัวอย่าง และ 7 ตัวอย่าง ไม่พบยีสต์ (ตารางที่ 4)

1.2 ผลการแยกเมทิลโลโทรฟิเคียสจากผิวใบพืช

เมื่อนำตัวอย่างมาแยกเมทิลโลโทรฟิเคียสโดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว 0.5% methanol-yeast nitrogen base (YNB) พบว่าจากตัวอย่างใบพืชทั้งหมด 97 ตัวอย่าง ที่ใช้แยกยีสต์ทั่วไปในข้อ 1.1 สามารถแยกเมทิลโลโทรฟิเคียสได้เพียง 18 สายพันธุ์ จาก 16 ตัวอย่าง และ 81 ตัวอย่าง ไม่พบเมทิลโลโทรฟิเคียส (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แหล่งที่เก็บตัวอย่างและผลการแยกยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิเคียสต์จากตัวอย่างใบพืชในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยจำนวน 20 แห่ง

การเก็บตัวอย่าง				รหัสยีสต์ที่แยกได้ด้วยวิธี enrichment	
แหล่ง	สถานที่	วัน เดือน ปี	ชนิดใบพืช	จากอาหารเหลว YM	จากอาหารเหลว 0.5% MtOH-YNB
1	ค่ายลูกเสือวชิราวุธ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี	26 เม.ย. 52	ประดู่ป่า	LM001	-
			สัก	LM002	-
			ยูคาลิปตัส	LM003	-
			มะม่วง	-	-
			กระถินณรงค์	LM004	-
			พุทธรักษา	LM005	-
			มะม่วงหิมพานต์	-	-
			ขนุน	LM006, LM007	-
			หูกวาง	-	-
			นนทรีป่า	LM008	-
			หางนกยูงฝรั่ง	LM009	-
			จามจุรี	-	-
			ค้อย	LM010	-
			โมก	-	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

แหล่ง	สถานที่	การเก็บตัวอย่าง		รหัสยีสต์ที่แยกได้ด้วยวิธี enrichment	
		วัน เดือน ปี	ชนิดใบพืช	จากอาหารเหลว YM	จากอาหารเหลว 0.5% MtOH-YNB
2	สำนักงานการท่องเที่ยวโรงเรียน จปร. จ.นครนายก	10 พ.ค. 52	ชบา	LM011	LN01
			มะขาม	LM012	-
			พญาสัตบรรณ	LM013	-
			สน	-	-
			ราชพฤกษ์	LM014	-
			มะพร้าว	LM015, LM016, LM017	-
			เฟื่องฟ้า	LM018	-
			ไม่รู้ชื่อ	LM019	-
			เข็ม	LM020	-
			มะละกอ	LM021	-
			ไผ่	LM022, LM023	LN03, LN04
			พุทรา	LM024	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

การเก็บตัวอย่าง				รหัสยีสต์ที่แยกได้ด้วยวิธี enrichment	
แหล่ง	สถานที่	วัน เดือน ปี	ชนิดใบพืช	จากอาหารเหลว YM	จากอาหารเหลว 0.5% MtOH-YNB
3	อ่างเก็บน้ำคลองโอบ จ.นครนายก	10 พ.ค. 52	ตะขบ	LM025, LM026, LM027	-
			หูกวาง	LM028	-
			สาบเสือ	LM029, LM030	-
4	เขื่อนขุนด่านปราการชล จ.นครนายก	10 พ.ค. 52	กระถินณรงค์	LM031, LM032, LM033, LM034	LN05
			ลีลาวดี	LM035, LM036	-
			มะขาม	LM037	-
5	อ่างเก็บน้ำจักรพงษ์ จ.ปราจีนบุรี	10 พ.ค. 52	ราชพฤกษ์	LM038, LM039	-
			หางนกยูงฝรั่ง	LM040	-
			เฟื่องฟ้า	LM041, LM042	-
			มะม่วง	LM043	-
			กระถินณรงค์	LM044, LM045	LN06
6	เขาอีโต้ จ.ปราจีนบุรี	10 พ.ค. 52	กระถิน	LM046	-
			สาบเสือ	LM047, LM048	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

การเก็บตัวอย่าง				รหัสยีสต์ที่แยกได้ด้วยวิธี enrichment	
แหล่ง	สถานที่	วัน เดือน ปี	ชนิดใบพืช	จากอาหารเหลว YM	จากอาหารเหลว 0.5% MtOH-YNB
7	อุทยานกบินทร์เฉลิมราชย์ จ.ปราจีนบุรี	10 พ.ค. 52	โพธิ์	LM049, LM050	-
			พญาสัตบรรณ	LM051	-
			มะขาม	LM052, LM053, LM054	-
			ประดู่	LM055, LM056	LN07
			ลีลาวดี	LM057, LM058	LN08
8	โครงการขุดลอกหนองสระหิน จ.สระแก้ว	11 พ.ค. 52	มะขามเทศ	LM059, LM060	-
9	อ่างเก็บน้ำบ้านห้วยชัน จ.สระแก้ว	11 พ.ค. 52	รัก	LM061	-
			พุทรา	LM062, LM063	-
			อ้อย	LM064, LM065	-
10	อ่างเก็บน้ำพระปรอง จ.สระแก้ว	11 พ.ค. 52	พญาสัตบรรณ	LM066	-
			ราชพฤกษ์	LM067	-
			ลีลาวดี	LM068, LM069	LN09
			บัว	LM070	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

แหล่ง	สถานที่	การเก็บตัวอย่าง		รหัสยีสต์ที่แยกได้ด้วยวิธี enrichment	
		วัน เดือน ปี	ชนิดใบพืช	จากอาหารเหลว YM	จากอาหารเหลว 0.5% MtOH-YNB
11	อ่างเก็บน้ำห้วยยาง จ.สระแก้ว	11 พ.ค. 52	สัก	LM071	-
			บอน	LM072	-
			รัก	LM073, LM074	-
			ไม่รู้ชื่อ	LM075	-
			มะพร้าว	LM076, LM077	-
12	แหล่งน้ำเพื่อการดับเพลิง จ.บุรีรัมย์	11 พ.ค. 52	ประดู่	LM078	-
			โพธิ์	LM079, LM080	-
			ไทรย้อย	LM081	-
			ดอกเข็ม	LM082	-
13	วัดห้วยมงคล อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	18 พ.ค. 52	มะยม	LM083	-
			สัปปะรด	LM084	-
			อ้อยแห้ง	LM085, LM086	LN10
14	บ้านทุ่งเสื่อนอน อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	18 พ.ค. 52	อ้อย	LM087	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

การเก็บตัวอย่าง				รหัสยีสต์ที่แยกได้ด้วยวิธี enrichment	
แหล่ง	สถานที่	วัน เดือน ปี	ชนิดใบพืช	จากอาหารเหลว YM	จากอาหารเหลว 0.5% MtOH-YNB
			อ้อยแห้ง	LM088	-
15	อ.ชุมพร จ.ชุมพร	18 พ.ค. 52	พุทรา	LM089	-
16	ปากน้ำชุมพร จ.ชุมพร	18 พ.ค. 52	ปาล์ม	LM090, LM091	LN11
			ปาล์มแห้ง	LM092, LM093, LM094	-
17	อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร	18 พ.ค. 52	ยางพารา	LM095	-
18	เกาะมาตรา จ.ชุมพร	19 พ.ค. 52	กล้วย	LM096	-
			ไม่รู้ชื่อ 1	LM097	-
			ไม่รู้ชื่อ 2	LM098, LM099	LN12, LN13
			ไม่รู้ชื่อ 3	LM100	LN14
			ไม่รู้ชื่อ 4	LM101, LM102	LN15
			ไม่รู้ชื่อ 5	LM103	-
			ไม่รู้ชื่อ 6	LM104	LN16
			ไม่รู้ชื่อ 7	LM105, LM106	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

การเก็บตัวอย่าง				รหัสยีสต์ที่แยกได้ด้วยวิธี enrichment	
แหล่ง	สถานที่	วัน เดือน ปี	ชนิดใบพืช	จากอาหารเหลว YM	จากอาหารเหลว 0.5% MtOH-YNB
			ไม่รู้ชื่อ 8	LM107, LM108	-
			ไม่รู้ชื่อ 9	LM109	-
			ไม่รู้ชื่อ 10	LM110	-
			ไม่รู้ชื่อ 11	LM111	-
			ไม่รู้ชื่อ 12	LM112	-
			ไม่รู้ชื่อ 13	LM113, LM114	-
			ไม่รู้ชื่อ 14	LM115	LN17
			ไม่รู้ชื่อ 15	LM116, LM117	LN18
			เฟิร์น	LM118, LM119, LM120	-
			อ้อย	LM121	-
			มะเดื่อ	LM122	-
			มะพร้าว	LM123	-
			มันสำปะหลัง	-	LN19

ตารางที่ 4 (ต่อ)

การเก็บตัวอย่าง				รหัสยีสต์ที่แยกได้ด้วยวิธี enrichment	
แหล่ง	สถานที่	วัน เดือน ปี	ชนิดใบพืช	จากอาหารเหลว YM	จากอาหารเหลว 0.5% MtOH-YNB
19	ทางหลวงชนบท กม. 7 อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร	20 พ.ค. 52	ไม่รู้ชื่อ	LM124	-
			ส้มโอ	LM125	-
			ไม่รู้ชื่อ	LM126	-
			มังคุด	LM127	-
			กล้วย	LM128, LM129	-
20	วัดทางสาย อ.บางสะพาน จ.ประจวบคีรีขันธ์	20 พ.ค. 52	สีลาวดี	LM130	-

หมายเหตุ: - คือ ตรวจไม่พบยีสต์

2. ผลการทดสอบการเจริญของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ

จากเมทิลโลโทรฟิเคียสต์จำนวน 18 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากข้อ 1.2 นำมาทดสอบการเจริญบนอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB ที่อุณหภูมิ 15, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจว่ายีสต์ที่แยกได้เป็นเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง เป็นเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic methylotrophic yeast) หรือเป็นเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant methylotrophic yeasts) โดยเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลางจะต้องเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 15 และ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง จะเจริญบนอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB ได้ดีทั้งที่ 15, 25 และ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่เมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่ชอบอุณหภูมิสูงจะไม่เจริญที่ 15 องศาเซลเซียส โดยในการทดลองครั้งนี้บนอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB ยีสต์ที่มีการเจริญน้อยมาก (+) ไม่จัดเป็นเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ เนื่องจากการเจริญที่น้อยมากนี้อาจไม่ได้เป็นการเจริญจากการใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แต่อาจเจริญจากการใช้สารประกอบคาร์บอนที่ได้จากเซลล์ยีสต์ที่ตายไปแล้ว โดยเปรียบเทียบกับผลการเจริญบนอาหารแข็ง YM ซึ่งเป็นอาหารสมบูรณ์ (complete medium) มีสารอาหารครบถ้วนสำหรับการเจริญของยีสต์ที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถเจริญได้ดีที่สุด หากยีสต์สายพันธุ์ใดเจริญบนอาหารแข็ง YM ที่อุณหภูมิ 15, 25 และ 37 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญบนอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB ที่อุณหภูมิดังกล่าว แสดงว่ายีสต์สายพันธุ์นั้นเป็นยีสต์ทนอุณหภูมิสูงแต่ไม่ได้เป็นเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบกับผลการเจริญของ *Ogataea nakhonphanomensis* S051 ซึ่งเป็นเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงซึ่งเจริญได้ที่ทั้ง 3 อุณหภูมิ (Limtong *et al.*, 2008a)

ผลการเจริญ แสดงดังตารางที่ 5 คือ บนอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB เมื่อบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีมากและดีมี 9 สายพันธุ์ ได้แก่ LN01, LN11, LN12, LN14, LN15, LN16, LN17, LN18 และ LN19 ส่วนยีสต์อีก 9 สายพันธุ์ เจริญได้น้อยมาก (+) แสดงว่ามียีสต์ 9 สายพันธุ์ ที่ยืนยันได้ว่าเป็นเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 15 และ 37 องศาเซลเซียส มีเพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ดี (+++) และดีมาก (++++) คือ LN11 และ LN19 ในขณะที่ยีสต์อีก 16 สายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้ที่ทั้งสองอุณหภูมินี้ และบนอาหารแข็ง YM ยีสต์ทั้ง 18 สายพันธุ์เจริญดีและดีมากที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 37 องศาเซลเซียส มี 10 สายพันธุ์ที่เจริญดีและดีมาก 1 สายพันธุ์เจริญดีปานกลาง (++) และมี 7 สายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้ (-) ที่อุณหภูมินี้

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สามารถแบ่งยีสต์จากผิวใบพืชที่แยกได้โดยการทำ enrichment ในอาหารเหลว 0.5% methanol-YNB เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

- 1) เมทิลโลโทรฟิเคียสต์มี 7 สายพันธุ์ ได้แก่ LN01, LN12, LN14, LN15, LN16, LN17 และ LN18
- 2) เมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ LN11 และ LN19
- 3) ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง มี 7 สายพันธุ์ ได้แก่ LN03, LN04, LN05, LN07, LN08, LN09 และ LN10
- 4) ยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ LN06 และ LN13

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบการเจริญของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ บนอาหารแข็ง YM และอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB

สายพันธุ์	การเจริญบนอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB			การเจริญบนอาหารแข็ง YM		
	15°C	25°C	37°C	15°C	25°C	37°C
	S051 (<i>Ogataea nakonphanomensis</i>)	++++	++++	++++	++++	++++
LN01	-	++++	-	++++	++++	++++
LN03	-	+	-	++++	++++	++++
LN04	-	+	-	++++	++++	++
LN05	-	+	-	++++	++++	+++
LN06	-	+	-	++++	++++	-
LN07	-	+	-	++++	++++	++++
LN08	-	+	-	++++	++++	++++
LN09	-	+	-	++++	++++	++++
LN10	-	+	-	++++	++++	++++
LN11	+++	++++	+++	++++	++++	++++

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สายพันธุ์	การเจริญบนอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB			การเจริญบนอาหารแข็ง YM		
	15°C	25°C	37°C	15°C	25°C	37°C
	LN12	-	++++	-	++++	++++
LN13	-	+	-	++++	++++	-
LN14	-	++++	-	++++	++++	-
LN15	-	+++	-	+++	+++	-
LN16	-	++++	-	++++	++++	-
LN17	-	++++	-	++++	++++	-
LN18	-	++++	-	++++	++++	+++
LN19	+++	++++	++++	++++	++++	++++

หมายเหตุ: +++++ คือ การเจริญดีมาก, +++ คือ การเจริญดี, ++ คือ การเจริญน้อย,
+ คือ การเจริญน้อยมาก, - คือ ไม่มีการเจริญ

3. การจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิเคียสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

จากการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิเคียสต์โดยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene (ขนาดประมาณ 500-600 นิวคลีโอไทด์) ของยีสต์สายพันธุ์ที่ต้องการจัดจำแนกกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณเดียวกันของยีสต์สปีชีส์ต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) ในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> และใช้หลักเกณฑ์ของ Kurtzman and Robnett (1998) ในการระบุว่ายีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่แยกได้เป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว (described species) (สปีชีส์ที่รู้จักแล้ว/known species) หรือเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย (undescribed species) หรือสปีชีส์ใหม่ (new species) โดยพิจารณาจากหลักเกณฑ์ดังนี้ คือ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ที่ต้องการ

จัดจำแนกกับยีสต์สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดในฐานข้อมูล หากมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (6 นิวคลีโอไทด์) จัดจำแนกยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์นั้นว่า เป็นยีสต์ต่างสปีชีส์กัน และถ้ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 1-3 นิวคลีโอไทด์ จัดจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกันหรือเป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันมาก และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยพิจารณาจากตำแหน่งบนต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene จากหลักการดังกล่าวข้างต้นสามารถจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปและเมทิลโดโทรฟิกยีสต์ได้ ดังนี้

3.1 ผลการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปและผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

จากยีสต์ทั่วไปทั้ง 128 สายพันธุ์ ที่แยกได้สามารถจัดจำแนกยีสต์ทั้งหมดออกเป็น 4 กลุ่ม (ตารางที่ 6) คือ

3.1.1 ยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว

การจัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว คือเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ที่จัดจำแนกกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลแล้วพบว่า สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดเป็นยีสต์ที่มีการตั้งชื่อ อธิบาย และตีพิมพ์แล้วและมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์เพียง 0-3 นิวคลีโอไทด์ จากการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปทั้ง 128 สายพันธุ์ พบว่า 111 สายพันธุ์ เป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว (86.72 เปอร์เซ็นต์) โดยส่วนใหญ่ (97 สายพันธุ์) เป็นแอสโคไมซิตัสยีสต์ ไฟลัม Ascomycota จัดจำแนกเป็น 14 สกุล 35 สปีชีส์ (ตารางที่ 6, 7 และภาพที่ 2, 3, 4) ในชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยอยู่ในวงศ์ต่างๆ ดังนี้

3.1.1.1 วงศ์ Candidaceae มี 1 สกุล คือ

1) *Candida* 16 สปีชีส์ ได้แก่ *Candida amphixiae*, *C. apicola*, *C. etchellsii*, *C. glabrata*, *C. jaroonii*, *C. maltosa*, *C. metapsilosis*, *C. nivariensis*, *C. nodaensis*, *C. parapsilosis*, *C. potacharoeniae*, *C. rugosa*, *C. sorboxylosa*, *C. stigmatis*, *C. tropicalis* และ *C. trypodendroni*

3.1.1.2 วงศ์ Saccharomycetaceae มี 10 สกุล คือ

- 1) *Debaryomyces* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Debaryomyces nepalensis*
- 2) *Hyphopichia* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Hyphopichia burtonii*
- 3) *Kazachstania* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Kazachstania siamensis*
- 4) *Kluyveromyces* 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Kluyveromyces marxianus*,

K. thermotolerans

- 5) *Kodamaea* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Kodamaea ohmeri*
- 6) *Meyerozyma* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Meyerozyma guilliermondii*
- 7) *Pichia* 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Pichia galeiformis*, *P. kudriavzevii* และ *P.*

rhodanensis

- 8) *Torulaspora* 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Torulaspora delbrueckii* และ

T. pretoriensis

- 9) *Starmerella* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Starmerella meliponinorum*
- 10) *Wickerhamomyces* (ชื่อเดิม คือ *Pichia*) 1 สปีชีส์ ได้แก่

Wickerhamomyces edaphicus

3.1.1.3 วงศ์ Saccharomycodaceae มี 1 สกุล คือ

- 1) *Hanseniaspora* 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Hanseniaspora opuntiae*, *H.*

guilliermondii, *H. thailandica*

3.1.1.4 วงศ์ Metschnikowiaceae มี 2 สกุล คือ

- 1) *Clavispora* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Clavispora lusitaniae*
- 2) *Metschnikowia* 1 สปีชีส์ ได้แก่ *Metschnikowia koreensis*

ส่วนยีสต์ที่เหลือ 2 สายพันธุ์ จัดเป็นเบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ อยู่ในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Hymenomycetes 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Trichosporon asahii* และอีก 1 สายพันธุ์ อยู่ในชั้น Urediniomycetes คือ *Sporidiobolus ruineniae* และอีก 12 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นราคล้ายยีสต์ (yeast like fungi) ในชั้น Euascomycetes อันดับ Dothideales วงศ์ Dothideaceae คือ *Aureobasidium pullulans*

ตารางที่ 6 ผลการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปสายพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว

Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides		No. gap	nucleotide substitutions		
			identity / total	% identity		No.	%	
			nucleotides					
LM001	AB617902	<i>Candida glabrata</i> (U44808)	580/581	99.8	0	1	0.2	<i>Candida glabrata</i>
LM002	AB617903	<i>Kazachstania siamensis</i> (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	<i>Kazachstania siamensis</i>
LM003	AB617904	<i>Candida stigmatis</i> (GQ184144)	422/423	99.8	1	0	0	<i>Candida stigmatis</i>
LM004	AB617905	<i>Candida etchellsii</i> (U45723)	482/482	100	0	0	0	<i>Candida etchellsii</i>
LM005	AB617906	<i>Candida apicola</i> (U45703)	478/480	99.6	0	2	0.4	<i>Candida apicola</i>
LM006	AB617907	<i>Pichia kudriavzevii</i> (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Pichia kudriavzevii</i>
LM007	AB617908	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> (AJ512453)	572/572	100	0	0	0	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
LM009	AB617910	<i>Kazachstania siamensis</i> (AB258462)	573/574	99.8	1	0	0	<i>Kazachstania siamensis</i>
LM010	AB617911	<i>Candida glabrata</i> (U44808)	580/581	99.8	0	1	0.2	<i>Candida glabrata</i>
LM011	AB617912	<i>Candida glabrata</i> (U73574)	580/581	99.8	0	1	0.2	<i>Candida glabrata</i>
LM012	AB617913	<i>Candida glabrata</i> (U44808)	580/581	99.8	0	1	0.2	<i>Candida glabrata</i>
LM013	AB617914	<i>Candida potacharoeniae</i> (AB537430)	450/450	100	0	0	0	<i>Candida potacharoeniae</i>
LM014	AB617915	<i>Candida nodaensis</i> (U45726)	482/482	100	0	0	0	<i>Candida nodaensis</i>
LM015	AB617916	<i>Sporidiobolus ruineniae</i> (AF387128)	573/574	99.8	0	1	0.2	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides identity / total nucleotides		No. gap	nucleotide substitutions		
			% identity	No.		%		
LM017	AB617918	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	571/571	100	0	0	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>
LM018	AB617919	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	577/578	99.8	0	1	0.2	<i>Aureobasidium pullulans</i>
LM019	AB617920	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM020	AB617921	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	571/571	100	0	0	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>
LM021	AB617922	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	575/575	100	0	0	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>
LM022	AB617923	<i>Hyphopichia burtonii</i> (U45712)	524/524	100	0	0	0	<i>Hyphopichia burtonii</i>
LM024	AB617925	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM025	AB617926	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	571/571	100	0	0	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>
LM026	AB617927	<i>Candida trypodendroni</i> (AF017240)	528/532	99.2	2	2	0.4	<i>Candida trypodendroni</i>
LM027	AB617928	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	578/578	100	0	0	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>
LM028	AB617929	<i>Wickerhamomyces edaphicus</i> (AB436763)	567/567	100	0	0	0	<i>Wickerhamomyces edaphicus</i>
LM029	AB617930	<i>Metschnikowia koreensis</i> (AF296438)	517/517	100	0	0	0	<i>Metschnikowia koreensis</i>
LM030	AB617931	<i>Pichia kudriavzevii</i> (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Pichia kudriavzevii</i>
LM031	AB617932	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	578/578	100	0	0	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides identity / total nucleotides		No. gap	nucleotide substitutions		
			% identity	No.		%		
LM032	AB617933	<i>Starmerella meliponinorum</i> (AF313354)	476/478	99.6	1	1	0.2	<i>Starmerella meliponinorum</i>
LM033	AB617934	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	578/578	100	0	0	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>
LM034	AB617935	<i>Candida amphixiae</i> (FJ614671)	540/542	99.6	0	2	0.4	<i>Candida amphixiae</i>
LM035	AB617936	<i>Starmerella meliponinorum</i> (AF313354)	476/478	99.6	1	1	0.2	<i>Starmerella meliponinorum</i>
LM036	AB617937	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	577/577	100	0	0	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>
LM037	AB617938	<i>Kodamaea ohmeri</i> (U45702)	486/486	100	0	0	0	<i>Kodamaea ohmeri</i>
LM038	AB617939	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	557/557	100	0	0	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>
LM039	AB617940	<i>Candida jaroonii</i> (DQ404493)	541/541	100	0	0	0	<i>Candida jaroonii</i>
LM040	AB617941	<i>Pichia kudriavzevii</i> (U76347)	562/562	100	0	0	0	<i>Pichia kudriavzevii</i>
LM041	AB617943	<i>Torulaspora delbrueckii</i> (U72156)	573/573	100	0	0	0	<i>Torulaspora delbrueckii</i>
LM042	AB617944	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	577/577	100	0	0	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>
LM043	AB617945	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> (AJ512453)	572/573	99.8	1	0	0	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
LM044	AB617946	<i>Pichia galeiformis</i> (U75738)	560/560	100	0	0	0	<i>Pichia galeiformis</i>
LM045	AB617947	<i>Torulaspora pretoriensis</i> (U72157)	573/574	99.8	1	0	0	<i>Torulaspora pretoriensis</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides identity / total nucleotides		No. gap	nucleotide substitutions		
			% identity	No.		%		
LM046	AB617948	<i>Hyphopichia burtonii</i> (U45712)	524/524	100	0	0	0	<i>Hyphopichia burtonii</i>
LM047	AB617949	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> (U69581)	571/571	100	0	0	0	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
LM048	AB617950	<i>Aureobasidium pullulans</i> (FJ515219)	571/571	100	0	0	0	<i>Aureobasidium pullulans</i>
LM049	AB617951	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM050	AB617952	<i>Candida rugosa</i> (U45727)	483/485	99.6	1	1	0.2	<i>Candida rugosa</i>
LM051	AB617953	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM052	AB617954	<i>Kodamaea ohmeri</i> (U45702)	491/493	99.6	0	2	0.4	<i>Kodamaea ohmeri</i>
LM053	AB617955	<i>Candida rugosa</i> (U45727)	482/487	99	3	2	0.4	<i>Candida rugosa</i>
LM054	AB617956	<i>Pichia kudriavzevii</i> (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Pichia kudriavzevii</i>
LM055	AB617957	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM057	AB617958	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM059	AB617959	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM060	AB617960	<i>Candida rugosa</i> (U45727)	483/485	99.6	1	1	0.2	<i>Candida rugosa</i>
LM061	AB617961	<i>Kodamaea ohmeri</i> (U45702)	493/493	100	0	0	0	<i>Kodamaea ohmeri</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides identity / total nucleotides		No. gap	nucleotide substitutions		
			% identity	No.		%		
LM062	AB617962	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM063	AB617963	<i>Pichia kudriavzevii</i> (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Pichia kudriavzevii</i>
LM064	AB617964	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> (AJ512453)	572/572	100	0	0	0	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
LM066	AB617966	<i>Candida rugosa</i> (U45727)	483/485	99.6	1	1	0.2	<i>Candida rugosa</i>
LM067	AB617967	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> (U84230)	569/572	99.5	1	2	0.4	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
LM069	AB617969	<i>Candida maltosa</i> (U45745)	572/572	100	0	0	0	<i>Candida maltosa</i>
LM070	AB617970	<i>Candida glabrata</i> (U44808)	580/581	99.8	0	1	0.2	<i>Candida glabrata</i>
LM071	AB617971	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM072	AB617972	<i>Candida rugosa</i> (U45727)	483/485	99.6	1	1	0.2	<i>Candida rugosa</i>
LM073	AB617973	<i>Pichia galeiformis</i> (U75738)	560/560	100	0	0	0	<i>Pichia galeiformis</i>
LM074	AB617974	<i>Candida rugosa</i> (U45727)	484/484	100	0	0	0	<i>Candida rugosa</i>
LM075	AB617975	<i>Pichia rhodanensis</i> (U73571)	571/576	99.1	3	2	0.4	<i>Pichia rhodanensis</i>
LM076	AB617976	<i>Hyphopichia burtonii</i> (U45712)	524/524	100	0	0	0	<i>Hyphopichia burtonii</i>
LM077	AB617977	<i>Candida metapsilosis</i> (FJ746055)	556/556	100	0	0	0	<i>Candida metapsilosis</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

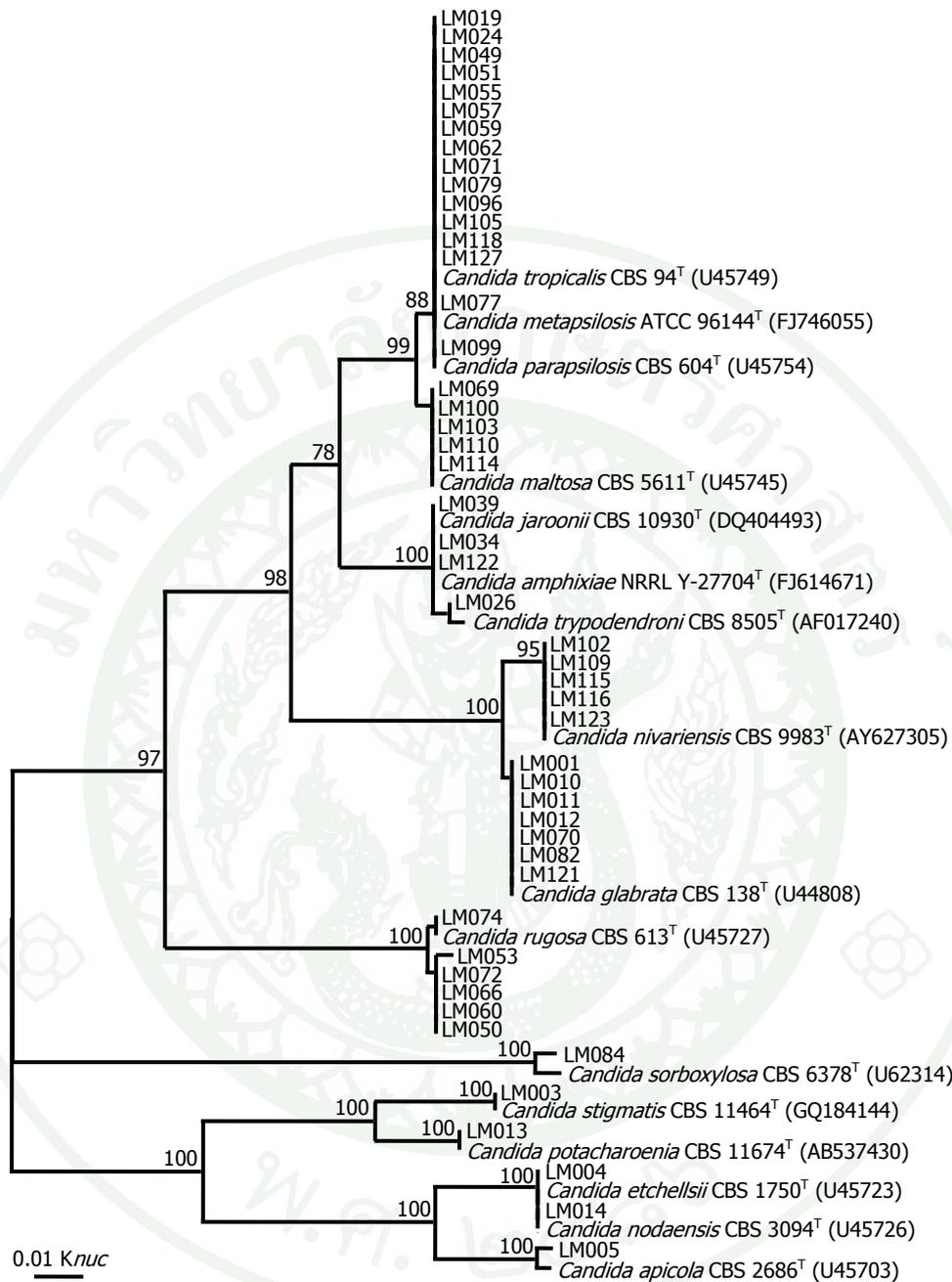
Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides identity / total nucleotides	% identity	No. gap	nucleotide substitutions		
						No.	%	
LM079	AB617979	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM080	AB617980	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> (AJ512453)	572/572	100	0	0	0	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>
LM081	AB617981	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (U94924)	544/545	99.8	0	1	0.2	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
LM082	AB617982	<i>Candida glabrata</i> (U44808)	580/581	99.8	0	1	0.2	<i>Candida glabrata</i>
LM083	AB617983	<i>Clavispora lusitaniae</i> (GQ396270)	517/517	100	0	0	0	<i>Clavispora lusitaniae</i>
LM084	AB617984	<i>Candida sorboxylosa</i> (U62314)	334/337	99.1	0	3	0.9	<i>Candida sorboxylosa</i>
LM085	AB617985	<i>Trichosporon asahii</i> (AF105393)	606/606	100	0	0	0	<i>Trichosporon asahii</i>
LM089	AB617989	<i>Pichia kudriavzevii</i> (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Pichia kudriavzevii</i>
LM090	AB617990	<i>Kodamaea ohmeri</i> (U45702)	493/493	100	0	0	0	<i>Kodamaea ohmeri</i>
LM091	AB617991	<i>Debaryomyces nepalensis</i> (U45839)	569/570	99.8	0	1	0.2	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
LM095	AB617995	<i>Debaryomyces nepalensis</i> (U45839)	569/570	99.8	0	1	0.2	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
LM096	AB617996	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM097	AB617997	<i>Hanseniaspora thailandica</i> (DQ404527)	572/572	100	0	0	0	<i>Hanseniaspora thailandica</i>
LM098	AB617998	<i>Hanseniaspora thailandica</i> (DQ404527)	579/579	100	0	0	0	<i>Hanseniaspora thailandica</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

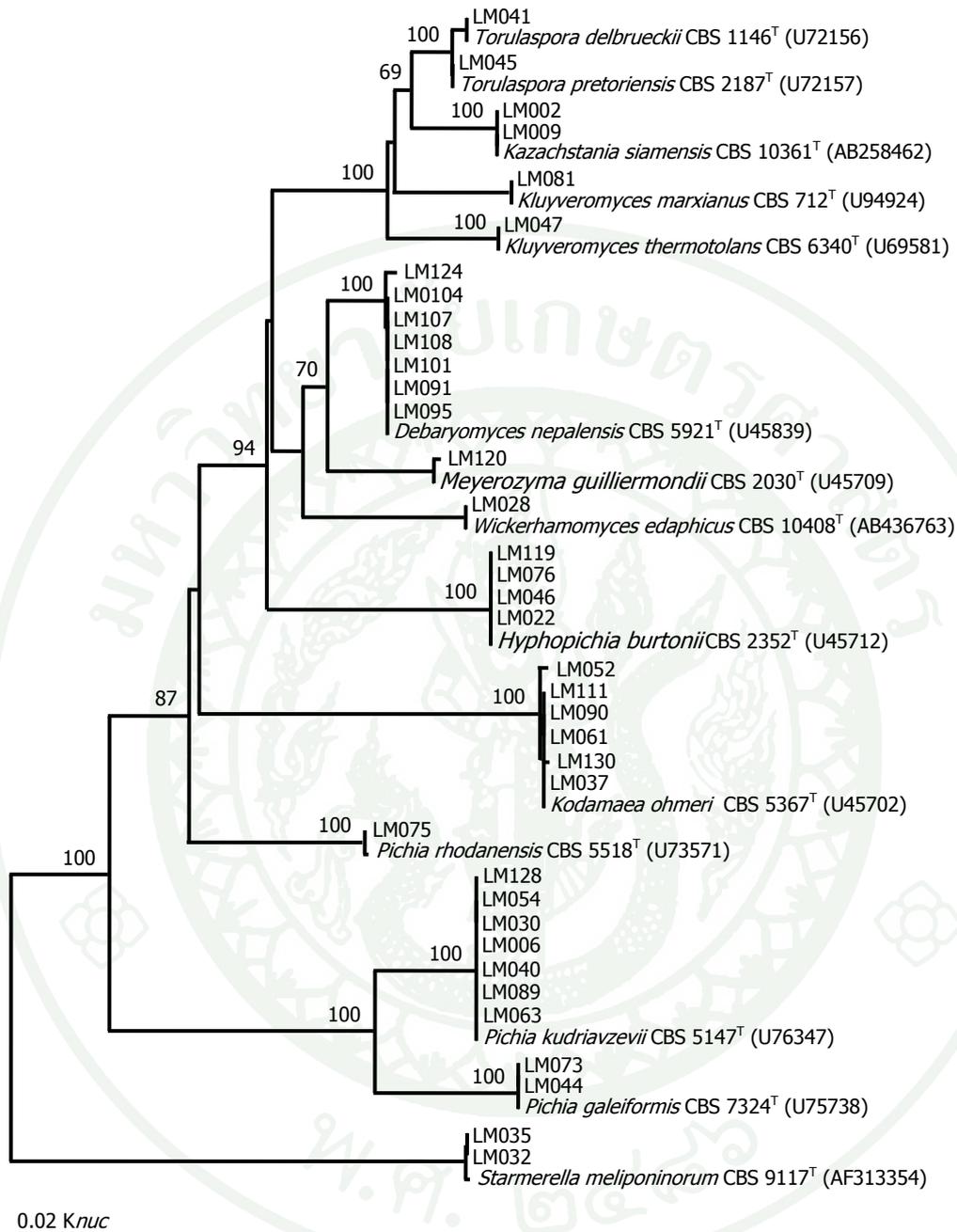
Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides identity / total nucleotides		No. gap	nucleotide substitutions		
			% identity	No.		%		
LM099	AB617999	<i>Candida parapsilosis</i> (U45754)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida parapsilosis</i>
LM100	AB618000	<i>Candida maltosa</i> (U45745)	570/572	99.7	0	2	0.4	<i>Candida maltosa</i>
LM101	AB618001	<i>Debaryomyces nepalensis</i> (U45839)	569/570	99.8	0	1	0.2	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
LM102	AB618002	<i>Candida nivariensis</i> (AY627305)	546/548	99.6	2	0	0	<i>Candida nivariensis</i>
LM103	AB618003	<i>Candida maltosa</i> (U45745)	570/572	99.7	0	2	0.4	<i>Candida maltosa</i>
LM104	AB618004	<i>Debaryomyces nepalensis</i> (U45839)	569/570	99.8	0	1	0.2	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
LM105	AB618005	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM107	AB618007	<i>Debaryomyces nepalensis</i> (U45839)	569/570	99.8	0	1	0.2	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
LM108	AB618008	<i>Debaryomyces nepalensis</i> (U45839)	569/570	99.8	0	1	0.2	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
LM109	AB618009	<i>Candida nivariensis</i> (AY627305)	546/548	99.6	2	0	0	<i>Candida nivariensis</i>
LM110	AB618010	<i>Candida maltosa</i> (U45745)	570/572	99.7	0	2	0.4	<i>Candida maltosa</i>
LM111	AB618011	<i>Kodamaea ohmeri</i> (U45702)	493/493	100	0	0	0	<i>Kodamaea ohmeri</i>
LM112	AB618012	<i>Hanseniaspora thailandica</i> (DQ404527)	579/579	100	0	0	0	<i>Hanseniaspora thailandica</i>
LM114	AB618014	<i>Candida maltosa</i> (U45745)	570/572	99.7	0	2	0.4	<i>Candida maltosa</i>

ตารางที่ 6 (ต่อ)

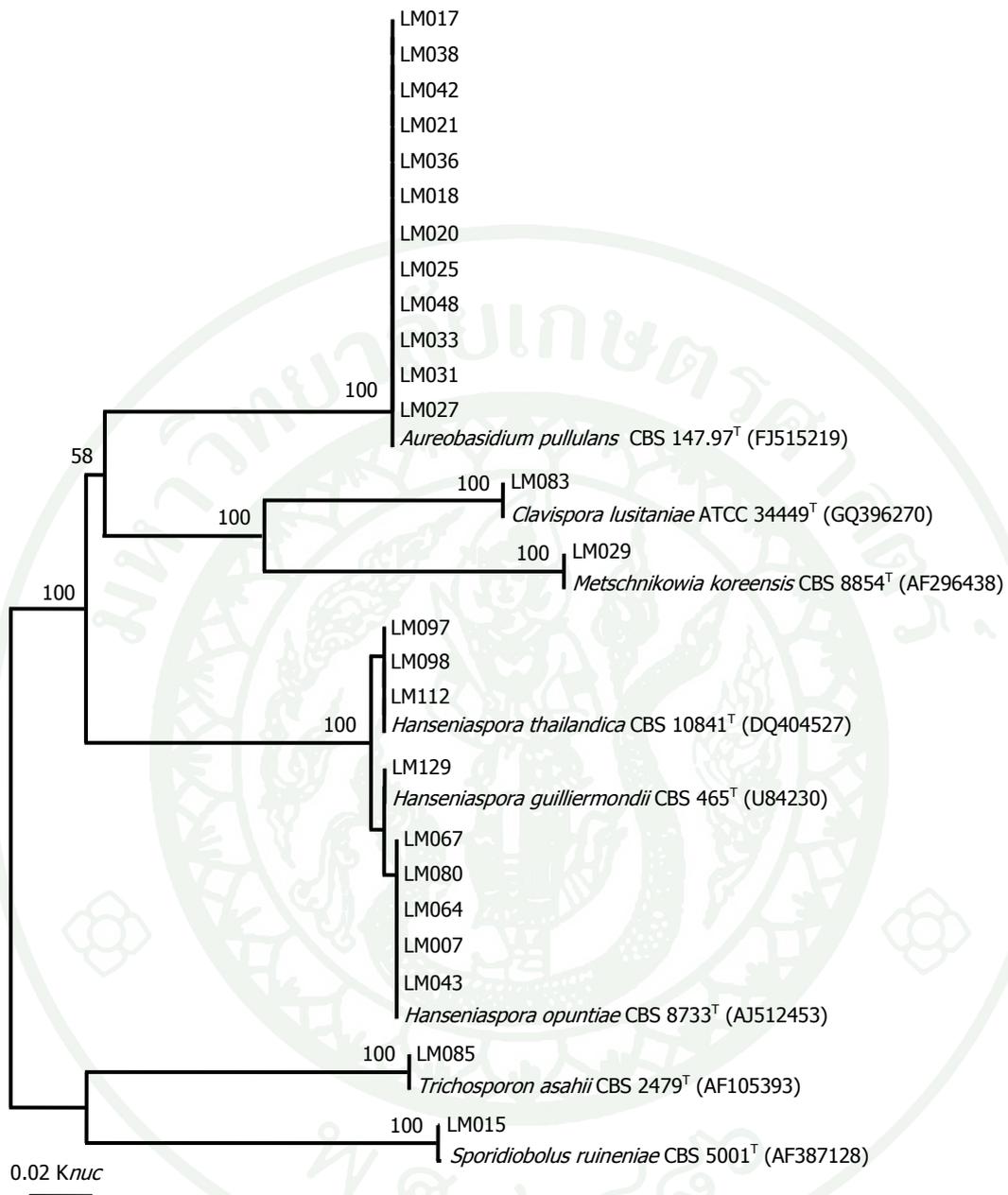
Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides		No. gap	nucleotide substitutions		
			identity / total	% identity		No.	%	
			nucleotides					
LM115	AB618015	<i>Candida nivariensis</i> (AY627305)	546/548	99.6	2	0	0	<i>Candida nivariensis</i>
LM116	AB618016	<i>Candida nivariensis</i> (AY627305)	546/548	99.6	2	0	0	<i>Candida nivariensis</i>
LM118	AB618018	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM119	AB618019	<i>Hyphopichia burtonii</i> (U45712)	524/524	100	0	0	0	<i>Hyphopichia burtonii</i>
LM120	AB618020	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (U45709)	568/570	99.7	0	2	0.4	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
LM121	AB618021	<i>Candida glabrata</i> (U44808)	580/581	99.8	0	1	0.2	<i>Candida glabrata</i>
LM122	AB618022	<i>Candida amphixiae</i> (AY520327)	531/533	99.6	0	2	0.4	<i>Candida amphixiae</i>
LM123	AB618023	<i>Candida nivariensis</i> (AY627305)	546/548	99.6	2	0	0	<i>Candida nivariensis</i>
LM124	AB618024	<i>Debaryomyces nepalensis</i> (U45839)	567/570	99.5	0	3	0.5	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
LM127	AB618027	<i>Candida tropicalis</i> (U45749)	570/570	100	0	0	0	<i>Candida tropicalis</i>
LM128	AB618028	<i>Pichia kudriavzevii</i> (U76347)	564/564	100	0	0	0	<i>Pichia kudriavzevii</i>
LM129	AB618029	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> (U84230)	572/572	100	0	0	0	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
LM130	AB618030	<i>Kodamaea ohmeri</i> (U45702)	492/493	99.8	0	1	0.2	<i>Kodamaea ohmeri</i>



ภาพที่ 2 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว ในวงศ์ Candidaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และ two-parameter ของ Kimura (1980) ประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว ในวงศ์ Saccharomycetaceae และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และ two-parameter ของ Kimura (1980) ประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว ในวงศ์ Dothideaceae, Metschnikowiaceae, Saccharomycodaceae, *Sporidiobolus ruineniae*, *Trichosporon asahii*, *Aureobasidium pullulans* และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และ two-parameter ของ Kimura (1980) ประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 7 ยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้ว

Group	Family	Strain	Number of strain
	Genus		
	Species		
Ascomycetous yeast			
Candidaceae			
<i>Candida</i>			
	<i>Candida amphixiae</i>	LM034, LM122	2
	<i>Candida apicola</i>	LM005	1
	<i>Candida etchellsii</i>	LM004	1
	<i>Candida glabrata</i>	LM001, LM010, LM011, LM012, LM070, LM082, LM121	7
	<i>Candida jaroonii</i>	LM039	1
	<i>Candida maltosa</i>	LM069, LM100, LM103, LM110, LM114	5
	<i>Candida metapsilosis</i>	LM077	1
	<i>Candida nivariensis</i>	LM102, LM109, LM115, LM116, LM123	5
	<i>Candida nodaensis</i>	LM014	1
	<i>Candida parapsilosis</i>	LM099	1
	<i>Candida potacharoeniae</i>	LM013	1
	<i>Candida rugosa</i>	LM050, LM053, LM060, LM066, LM072, LM074	6
	<i>Candida sorboxylosa</i>	LM084	1
	<i>Candida stigmatis</i>	LM003	1
	<i>Candida tropicalis</i>	LM019, LM024, LM049, LM051, LM055, LM057, LM059, LM062, LM071, LM079, LM096, LM105, LM118, LM127	14
	<i>Candida trypodendroni</i>	LM026	1
Saccharomycetaceae			
<i>Debaryomyces</i>			
	<i>Debaryomyces nepalensis</i>	LM091, LM095, LM101, LM104, LM107, LM108, LM124	7

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Group	Family	Strain	Number of strain
	Genus		
	Species		
	<i>Hyphopichia</i>		
	<i>Hyphopichia burtonii</i>	LM022, LM046, LM076, LM119	4
	<i>Kazachstania</i>		
	<i>Kazachstania siamensis</i>	LM002, LM009	2
	<i>Kluyveromyces</i>		
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	LM081	1
	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	LM047	1
	<i>Kodamaea</i>		
	<i>Kodamaea ohmeri</i>	LM037, LM052, LM061, LM090, LM111, LM130	6
	<i>Meyerozyma</i>		
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	LM120	1
	<i>Pichia</i>		
	<i>Pichia galeiformis</i>	LM044, LM073	2
	<i>Pichia kudriavzevii</i>	LM006, LM030, LM040, LM054, LM063, LM089, LM128	7
	<i>Pichia rhodanensis</i>	LM075	1
	<i>Torulaspora</i>		
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LM041	1
	<i>Torulaspora pretoriensis</i>	LM045	1
	<i>Starmerella</i>		
	<i>Starmerella meliponinorum</i>	LM032, LM035	2
	<i>Wickerhamomyces (Pichia)</i>		
	<i>Wickerhamomyces edaphicus</i>	LM028	1
	Saccharomycodaceae		
	<i>Hanseniaspora</i>		
	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	LM007, LM043, LM064, LM080	4
	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	LM067, LM129	2

ตารางที่ 7 (ต่อ)

Group	Family	Strain	Number of strain
	Genus		
	Species		
	<i>Hanseniaspora thailandica</i>	LM097, LM098, LM112	3
	Metschnikowiaceae		
	<i>Clavispora</i>		
	<i>Clavispora lusitaniae</i>	LM083	1
	<i>Metschnikowia</i>		
	<i>Metschnikowia koreensis</i>	LM029	1
	รวม 12 สกุล 35 สปีชีส์ 97 สายพันธุ์		
	Basidiomycetous yeast		
	<i>Trichosporon</i>		
	<i>Trichosporon asahii</i>	LM085	1
	<i>Sporidiobolus</i>		
	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	LM015	1
	รวม 2 สกุล 2 สปีชีส์ 2 สายพันธุ์		
	Yeast-like fungi		
	Dothideaceae		
	<i>Aureobasidium</i>		
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	LM017, LM018, LM020, LM021, LM025, LM027, LM031, LM033, LM036, LM038, LM042, LM048	12
	รวม 1 สกุล 1 สปีชีส์ 12 สายพันธุ์		

3.1.2 ยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

การจัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย คือเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ที่ต้องการจัดจำแนกกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลแล้วพบว่า สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดเป็นยีสต์ที่ยังไม่มีการตั้งชื่ออธิบาย และตีพิมพ์ มีเฉพาะการฝาก (deposit) ลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในฐานข้อมูล และมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 0-3 นิวคลีโอไทด์ จากการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไป 128 สายพันธุ์ พบว่ายีสต์ 5 สายพันธุ์ (3.91 เปอร์เซ็นต์) เหมือนกับยีสต์ที่ยังไม่มีการอธิบาย โดยยีสต์ทั้งหมดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales ใน 3 วงศ์ (ตารางที่ 8, 10 และภาพที่ 5) คือ

3.1.2.1 วงศ์ Candidaceae มี 2 สกุล คือ สายพันธุ์ LM125 และ LM126 เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. 05-7-186T และสายพันธุ์ LM092 เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. SKK15

3.1.2.2 วงศ์ Saccharomycetaceae มี 1 สกุล คือ สายพันธุ์ LM023 เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Pichia* sp. ST-335

3.1.1.3 วงศ์ Saccharomycodaceae มี 1 สกุล คือ สายพันธุ์ LM117 เป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Wickerhamia* sp. ST-122

ตารางที่ 8 ผลการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปสายพันธุ์ที่เหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย

Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides identity / total nucleotides	% identity	No. gap	nucleotide substitutions		
						No.	%	
LM023	AB617924	<i>Pichia</i> sp. ST-335 (DQ404505)	530/530	100	0	0	0	Undescribed species
		<i>Pichia mexicana</i> (U45797)	522/531	98.3	1	8	1.5	
LM092	AB617992	<i>Geotrichum</i> sp. SKK15 (AB500211)	545/545	100	0	0	0	Undescribed species
		<i>Galactomyces geotrichum</i> (U40118)	533/546	97.6	1	12	2.2	
LM117	-	<i>Wickerhamia</i> sp. ST-122 (DQ404462)	545/546	99.8	0	1	0.2	Undescribed species
		<i>Hyphopichia pseudoburtonii</i> (GQ389650)	468/505	92.7	12	25	5.0	
LM125	AB618025	<i>Candida</i> sp. 05-7-186T (FJ537069)	495/495	100	0	0	0	Undescribed species
		<i>Kodamaea ohmeri</i> (U45702)	482/495	97.4	2	11	2.2	
LM126	AB618026	<i>Candida</i> sp. 05-7-186T (FJ537069)	495/495	100	0	0	0	Undescribed species
		<i>Kodamaea ohmeri</i> (U45702)	482/495	97.4	2	11	2.2	

3.1.3 ยีสต์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปิซีสที่อธิบายแล้วหรือสปิซีสใหม่

การจัดจำแนกเป็นยีสต์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปิซีสที่อธิบายแล้วหรือสปิซีสใหม่ คือ เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ที่จัดจำแนก กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์สปิซีสที่อธิบายแล้ว พบมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 3 นิวคลีโอไทด์ แต่มีเปอร์เซ็นต์การแทนที่นิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (6 นิวคลีโอไทด์) ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นยีสต์สปิซีสที่อธิบายแล้วหรือเป็นยีสต์สปิซีสใหม่ จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม จากการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไป 128 สายพันธุ์ พบว่า มียีสต์ 9 สายพันธุ์ (7.03 เปอร์เซ็นต์) ที่อาจจะเป็นยีสต์สปิซีสที่อธิบายแล้วหรือสปิซีสใหม่ โดยยีสต์ 8 สายพันธุ์ อยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales ใน 2 วงศ์ (ตารางที่ 9, 10 และภาพที่ 6) คือ

3.1.3.1 วงศ์ Candidaceae พบ 1 สกุล คือ สายพันธุ์ LM093 ใกล้เคียงกับ *Candida sojae*

3.1.3.2 วงศ์ Saccharomycetaceae พบ 1 สกุล คือ สายพันธุ์ LM016 ใกล้เคียงกับ *Pichia myanmaensis*, สายพันธุ์ LM065, LM086, LM087, LM088 และ LM094 ใกล้เคียงกับ *Meyerozyma guilliermondii* และสายพันธุ์ LM106 ใกล้เคียงกับ *Pichia bimundalis*

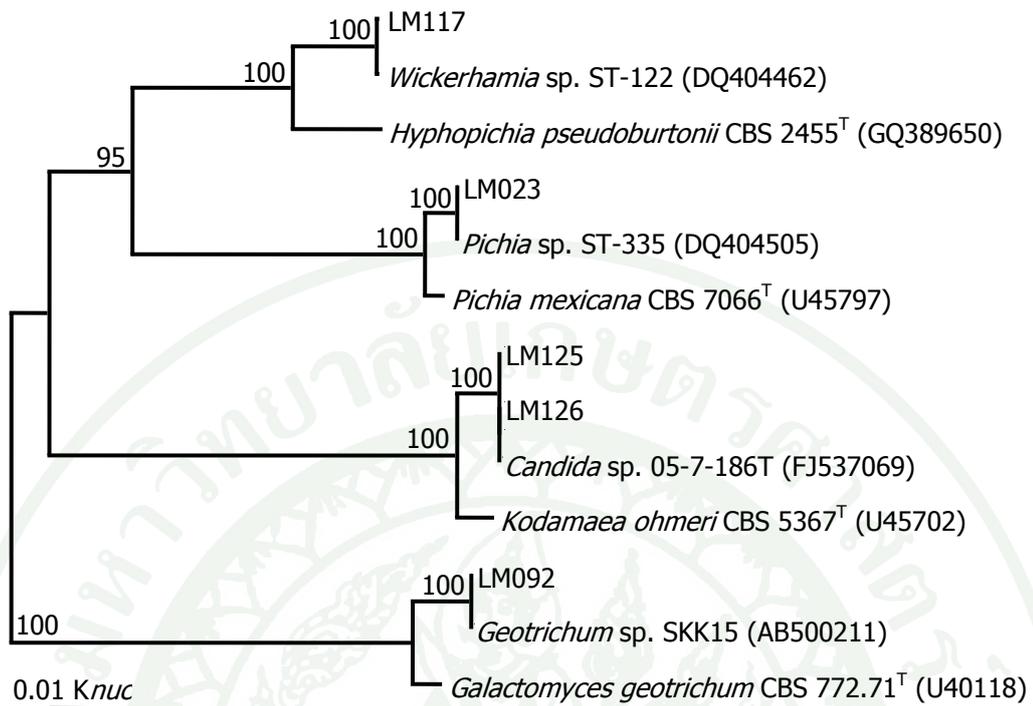
ส่วนยีสต์ที่เหลืออีก 1 สายพันธุ์ จัดเป็นเบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ อยู่ในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Hymenomycetes คือ สายพันธุ์ LM113 ใกล้เคียงกับ *Trichosporon mycotoxinivorans* (ตารางที่ 9, 10 และภาพที่ 6)

ตารางที่ 9 ผลการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่

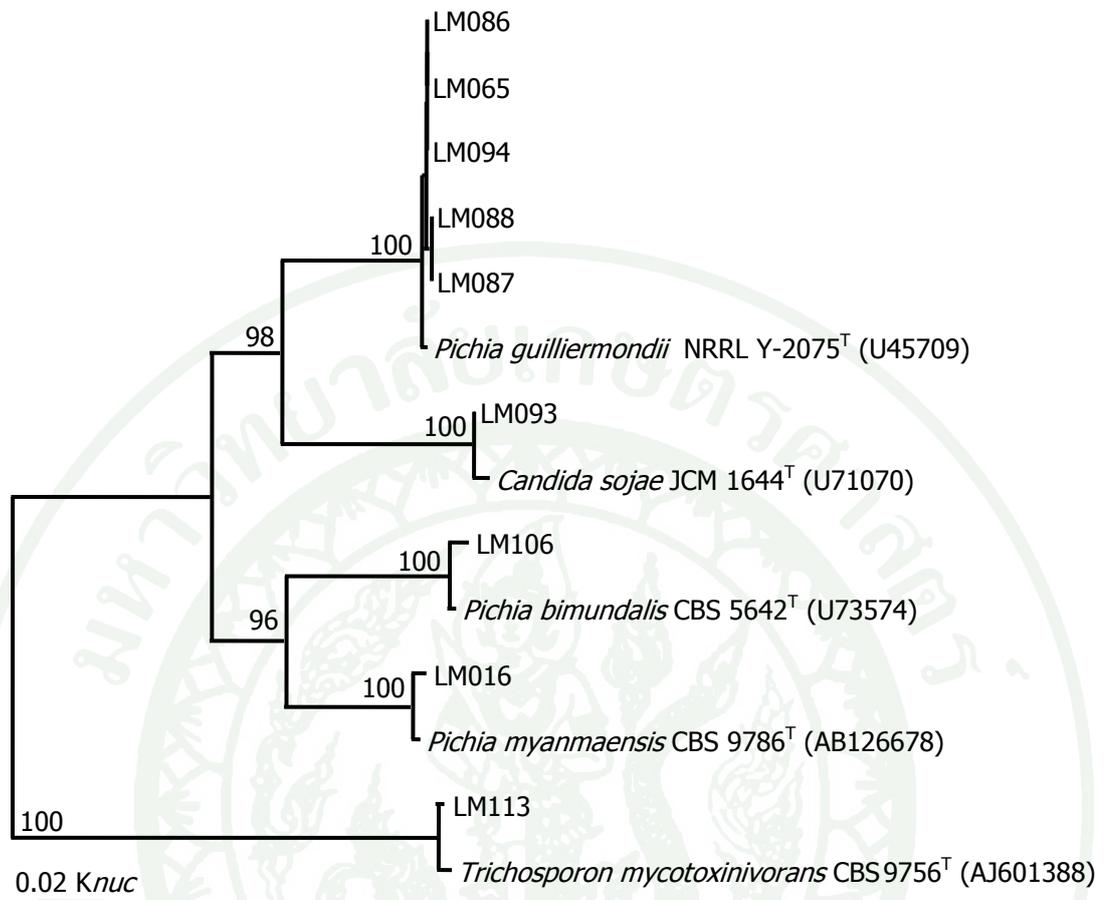
Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides		nucleotide			
			identity / total	% identity	No. gap	substitutions		
			nucleotides		No.	%		
LM016	AB617917	<i>Pichia myanmaensis</i> (AB126678)	569/573	99.3	0	4	0.7	known or new species
LM065	AB617965	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (U45709)	566/570	99.3	0	4	0.7	known or new species
LM086	AB617986	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (U45709)	566/570	99.3	0	4	0.7	known or new species
LM087	AB617987	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (U45709)	565/570	99.1	0	5	0.9	known or new species
LM088	AB617988	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (U45709)	565/570	99.1	0	5	0.9	known or new species
LM093	AB617993	<i>Candida sojae</i> (U71070)	567/572	99.1	1	4	0.7	known or new species
LM094	AB617994	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (U45709)	566/570	99.3	0	4	0.7	known or new species
LM106	AB618006	<i>Pichia bimundalis</i> (U73574)	565/570	99.0	0	5	0.9	known or new species
LM113	AB618013	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388)	601/606	99.2	1	4	0.7	known or new species

ตารางที่ 10 ยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายและสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่

Strain	Similar to
สายพันธุ์ที่เหมือนสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย	
LM125, LM126	<i>Candida</i> sp. 05-7-186T
LM092	<i>Geotrichum</i> sp. SKK15
LM023	<i>Pichia</i> sp. ST-335
LM117	<i>Wickerhamia</i> sp. ST-122
รวม 4 สกุล 4 สปีชีส์ 5 สายพันธุ์	
สายพันธุ์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่	
LM093	<i>Candida sojae</i>
LM065, LM086, LM087, LM088, LM094	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
LM106	<i>Pichia bimundalis</i>
LM016	<i>Pichia myanmaensis</i>
LM113	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
รวม 3 สกุล 5 สปีชีส์ 9 สายพันธุ์	



ภาพที่ 5 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย สปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุดที่อธิบายแล้ว และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุดที่ยังไม่มีการอธิบาย โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และ two-parameter ของ Kimura (1980) ประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 6 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทั่วไปที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และ two-parameter ของ Kimura (1980) ประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

3.1.4 ยีสต์สปีชีส์ใหม่

สำหรับการระบุว่าเป็นสปีชีส์ใหม่ (new species) ใช้การพิจารณาจากเกณฑ์ของ Kurtzman and Robnett (1998) คือเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ที่จัดจำแนกกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ที่มีรายงาน พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดในฐานข้อมูล มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (6 นิวคลีโอไทด์) จึงจัดจำแนกให้เป็นสปีชีส์ใหม่ โดยจากการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไป 128 สายพันธุ์ พบว่ามียีสต์เพียง 3 สายพันธุ์ (2.34 เปอร์เซ็นต์) จัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales ที่อยู่ในวงศ์ Candidaceae ทั้ง 3 สายพันธุ์ (ตารางที่ 11) คือ สายพันธุ์ LM008 ซึ่งมี *Candida bombi* เป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดแต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 9.2 เปอร์เซ็นต์ (45 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 8 ตำแหน่งใน 487 นิวคลีโอไทด์) และสายพันธุ์ LM068 และ LM078 มี *Candida morakotiae* เป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดแต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 2.3 เปอร์เซ็นต์ (13 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 2 ตำแหน่งใน 569 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์ จะได้ศึกษาลักษณะต่างๆ เพิ่มเติมตามเกณฑ์มาตรฐานและเสนอตั้งชื่อต่อไป

ตารางที่ 11 ผลการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปสายพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์ใหม่

Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides identity / total nucleotides	% identity	No. gap	nucleotide substitutions		
						No.	%	
LM008	AB617909	<i>Candida bombi</i> (U45706)	434/487	89.1	8	45	9.2	New species
LM068	AB617968	<i>Candida morakotiae</i> (DQ400364)	554/569	98	2	13	2.3	New species
LM078	AB617978	<i>Candida morakotiae</i> (DQ400364)	554/569	98	2	13	2.3	New species

3.2 ผลการจัดจำแนกเมทิลโล โทรฟิเคียสต์

จากเมทิลโล โทรฟิเคียสต์ 9 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากข้อ 1.2 สามารถจัดจำแนกเมทิลโล โทรฟิเคียสต์ทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่ม ตามหลักการเช่นเดียวกันกับในข้อ 3.1 คือ

3.2.1 ยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว

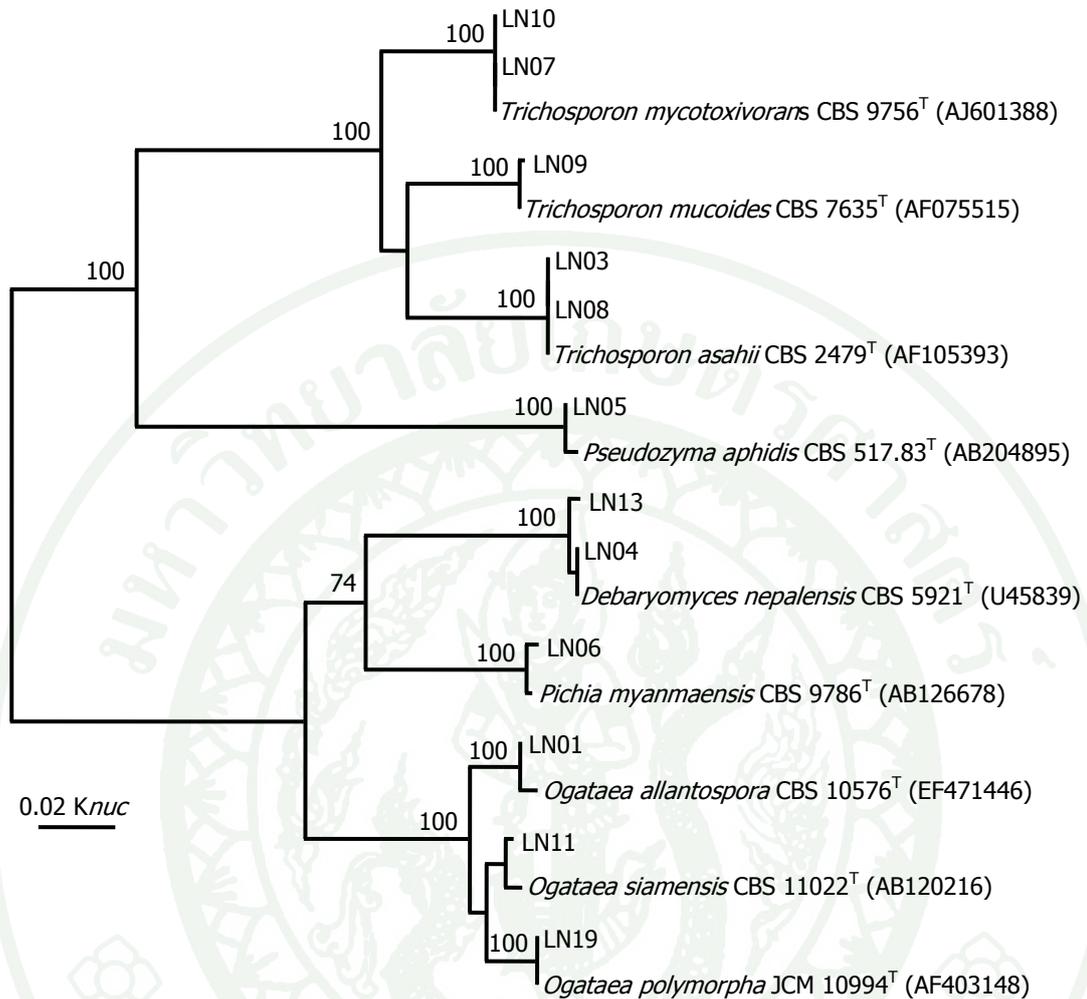
ผลการจัดจำแนกเมทิลโล โทรฟิเคียสต์ 9 สายพันธุ์ พบว่ามีเมทิลโล โทรฟิเคียสต์ เพียง 1 สายพันธุ์ เป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว (11.1 เปอร์เซ็นต์) โดยจัดเป็นแอสโคไมซีตยีสต์ ไฟล์ม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales วงศ์ Saccharomycetaceae คือ *Ogataea polymorpha* (ตารางที่ 12 และภาพที่ 7)

3.2.2 ยีสต์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ (could be known or new species)

จากการจัดจำแนกเมทิลโล โทรฟิเคียสต์ 9 สายพันธุ์ พบว่า มีเมทิลโล โทรฟิเคียสต์ 2 สายพันธุ์ (22.2 เปอร์เซ็นต์) ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ โดยเมทิลโล โทรฟิเคียสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์จัดอยู่ในไฟล์ม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales วงศ์ Saccharomycetaceae ใน 2 สกุล 2 สปีชีส์ คือ สายพันธุ์ LN01 ใกล้เคียงกับ *Ogataea allantospora* โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene 0.7 เปอร์เซ็นต์ (4 นิวคลีโอไทด์ใน 565 นิวคลีโอไทด์) และสายพันธุ์ LN11 ใกล้เคียงกับ *Ogataea siamensis* โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (4 นิวคลีโอไทด์ใน 565 นิวคลีโอไทด์) (ตารางที่ 12 และภาพที่ 7) โดยทั้ง 2 สายพันธุ์มีตำแหน่งในต้นไม้วิวัฒนาการใกล้เคียงกับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด

ตารางที่ 12 ผลการจัดจำแนกเมทิล โด โทรฟิเคียสต์สายพันธุ์ที่เหมือนกับสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วและสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่

Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides identity / total nucleotides	% identity	No. gap	nucleotide substitutions		
						No.	%	
LN19	AB617901	<i>Ogataea polymorpha</i> (AF403148)	566/566	100	0	0	0.0	<i>Ogataea polymorpha</i>
LN01	AB617889	<i>Ogataea allantospora</i> (EF471446)	561/565	99.3	0	4	0.7	could be known/ new species
LN11	AB617898	<i>Ogataea siamensis</i> (AB120216)	561/565	99.3	0	4	0.7	could be known/ new species



ภาพที่ 7 ต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วสปีชีส์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงที่สุด โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และ two-parameter ของ Kimura (1980) ประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

3.2.3 ยีสต์สปีชีส์ใหม่ (new species)

จากการจัดจำแนกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ 9 สายพันธุ์ พบว่ามีเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ 6 สายพันธุ์ (66.67 เปอร์เซ็นต์) เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales ที่อยู่ในวงศ์ Candidaceae 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ LN15 ซึ่งมี *Candida* sp. ZIM 2322 เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่ใกล้เคียงที่สุด และมี *Ogataea dorogensis* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วที่ใกล้เคียงที่สุด และสายพันธุ์ LN17 มี *Candida* sp. NRRL YB-2442 เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่ใกล้เคียงที่สุด และมี *Ogataea cecidiorum* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วที่ใกล้เคียงที่สุด และอีก 4 สายพันธุ์จัดอยู่ในวงศ์ Saccharomycetaceae คือ สายพันธุ์ LN12, LN14, LN16 และ LN18 ซึ่งมี *Ogataea* sp. NCAIM Y. 01896 เป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบายที่ใกล้เคียงที่สุด และมี *Ogataea minuta* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วที่ใกล้เคียงที่สุด (ตารางที่ 13) ซึ่งทั้ง 6 สายพันธุ์ได้ศึกษาลักษณะต่างๆ เพิ่มเติมตามเกณฑ์มาตรฐานและเสนอตั้งชื่อต่อไป

ตารางที่ 13 ผลการจัดจำแนกเมทิลโดโทรฟิเคียสต์สายพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์ใหม่

Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides identity / total nucleotides	% identity	No. gap	nucleotide substitutions		
						No.	%	
LN12	AB600531	<i>Ogataea</i> sp. NCAIM Y.01896 (GQ265921)	557/566	98.4	1	8	1.4	New species
		<i>Ogataea minuta</i> (EU011618)	555/565	98.2	0	10	1.8	
LN14	AB600532	<i>Ogataea</i> sp. NCAIM Y.01896 (GQ265921)	557/566	98.4	1	8	1.4	New species
		<i>Ogataea minuta</i> (EU011618)	557/567	98.2	0	10	1.8	
LN15	AB604652	<i>Candida</i> sp. ZIM 2322 (FR690079)	552/570	96.8	2	16	2.8	New species
		<i>Ogataea dorogensis</i> (EU011620)	549/570	96.3	3	19	3.2	
LN16	AB600533	<i>Ogataea</i> sp. NCAIM Y.01896 (GQ265921)	557/566	98.4	1	8	1.4	New species
		<i>Ogataea minuta</i> (EU011618)	557/567	98.2	0	10	1.8	
LN17	AB604653	<i>Candida</i> sp. NRRL YB-2442 (EU011615)	545/566	96.3	1	20	3.5	New species
		<i>Ogataea cecidiorum</i> (FJ897742)	544/566	96.1	1	21	3.7	
LN18	AB617900	<i>Ogataea</i> sp. NCAIM Y.01896 (GQ265921)	558/566	98.6	1	7	1.2	New species
		<i>Ogataea minuta</i> (EU011618)	556/565	98.4	0	9	1.6	

ส่วนยีสต์ที่เหลืออีก 9 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากอาหาร 0.5% methanol-YNB เช่นกัน แต่จากการทดสอบการเจริญในอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB พบว่าทั้ง 9 สายพันธุ์ไม่ใช่เมทิลโลโทรฟิเคียสต์ เมื่อนำมาจัดจำแนกพบว่า ผลสอดคล้องกัน คือ ยีสต์ทั้ง 9 สายพันธุ์ ไม่ใช่เมทิลโลโทรฟิเคียสต์จริง โดยยีสต์ทั้ง 9 สายพันธุ์ จัดจำแนกได้ ดังนี้คือ จัดเป็นแอสโคไมซีตส์ยีสต์สปิซีสส์ที่อธิบายแล้ว 8 สายพันธุ์ ไฟลัม Ascomycota 2 สายพันธุ์ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 7) ในชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales วงศ์ Saccharomycetaceae ใน 1 สกุล 1 สปีชีส์ คือ *Debaryomyces nepalensis* ส่วนอีก 6 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็นเบสิดิโอไมซีตส์ยีสต์ที่มีการอธิบายแล้วในไฟลัม Basidiomycota ชั้น Hymenomycetes 5 สายพันธุ์ ใน 1 สกุล 3 สปีชีส์ ได้แก่ *Trichosporon asahii*, *T. mucoides* และ *T. mycotoxinivorans* และอีก 1 สายพันธุ์อยู่ในชั้น Ustilaginomycetes คือ *Pseudozyma aphidis* และมีอีก 1 สายพันธุ์ ที่อาจจะเป็นยีสต์สปิซีสส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ โดยจัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales วงศ์ Saccharomycetaceae คือ สายพันธุ์ LN06 ซึ่งใกล้เคียงกับ *Pichia myanmaensis* โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (4 นิวคลีโอไทด์ใน 573 นิวคลีโอไทด์) (ตารางที่ 14 และภาพที่ 7)

จากผลการทดสอบทั้งหมดระหว่างยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่แยกได้จากอาหาร 0.5% methanol-YNB นั้น เมื่อนำมาสร้างแผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการร่วมกัน (ภาพที่ 7) พบว่ายีสต์และเมทิลโลโทรฟิเคียสต์แยกกลุ่มออกจากกันอย่างชัดเจน โดยเมทิลโลโทรฟิเคียสต์จะอยู่ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันและแยกออกจากกลุ่มของยีสต์ทั่วไป ซึ่งเป็นผลที่สอดคล้องกับผลจากการทดสอบการเจริญของยีสต์บนอาหารแข็ง 0.5% methanol-YNB และผลการจัดจำแนกก่อนหน้านี้ ดังที่ได้อธิบายแล้วในข้างต้น

ตารางที่ 14 ผลการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไปที่แยกได้จากอาหาร 0.5% methanol-YNB ทั้งสปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วและสปีชีส์ที่อาจเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่

Strain	Accession number	Closest Species with GenBank Accession Number	Nucleotide identity in D1/D2 domain		Nucleotide different in D1/D2 domain			Result of identification
			No. nucleotides identity / total nucleotides	% identity	No. gap	nucleotide substitutions		
						No.	%	
LN03	AB617890	<i>Trichosporon asahii</i> (AF105393)	597/597	100	0	0	0.0	<i>Trichosporon asahii</i>
LN04	AB617891	<i>Debaryomyces nepalensis</i> (U45839)	570/570	100	0	0	0.0	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
LN05	AB617892	<i>Pseudozyma aphidis</i> (AB204895)	598/601	99.5	0	3	0.5	<i>Pseudozyma aphidis</i>
LN07	AB617894	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388)	595/596	99.8	1	0	0.0	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
LN08	AB617895	<i>Trichosporon asahii</i> (AF105393)	597/597	100	0	0	0.0	<i>Trichosporon asahii</i>
LN09	AB617896	<i>Trichosporon mucoides</i> (AF075515)	594/596	99.7	0	2	0.4	<i>Trichosporon mucoides</i>
LN10	AB617897	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (AJ601388)	595/596	99.8	1	0	0.0	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
LN13	AB617899	<i>Debaryomyces nepalensis</i> (U45839)	567/570	99.5	0	3	0.5	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
LN06	AB617893	<i>Pichia myanmaensis</i> (AB126678)	569/573	99.3	0	4	0.7	could be known/ new species

4. การอธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่

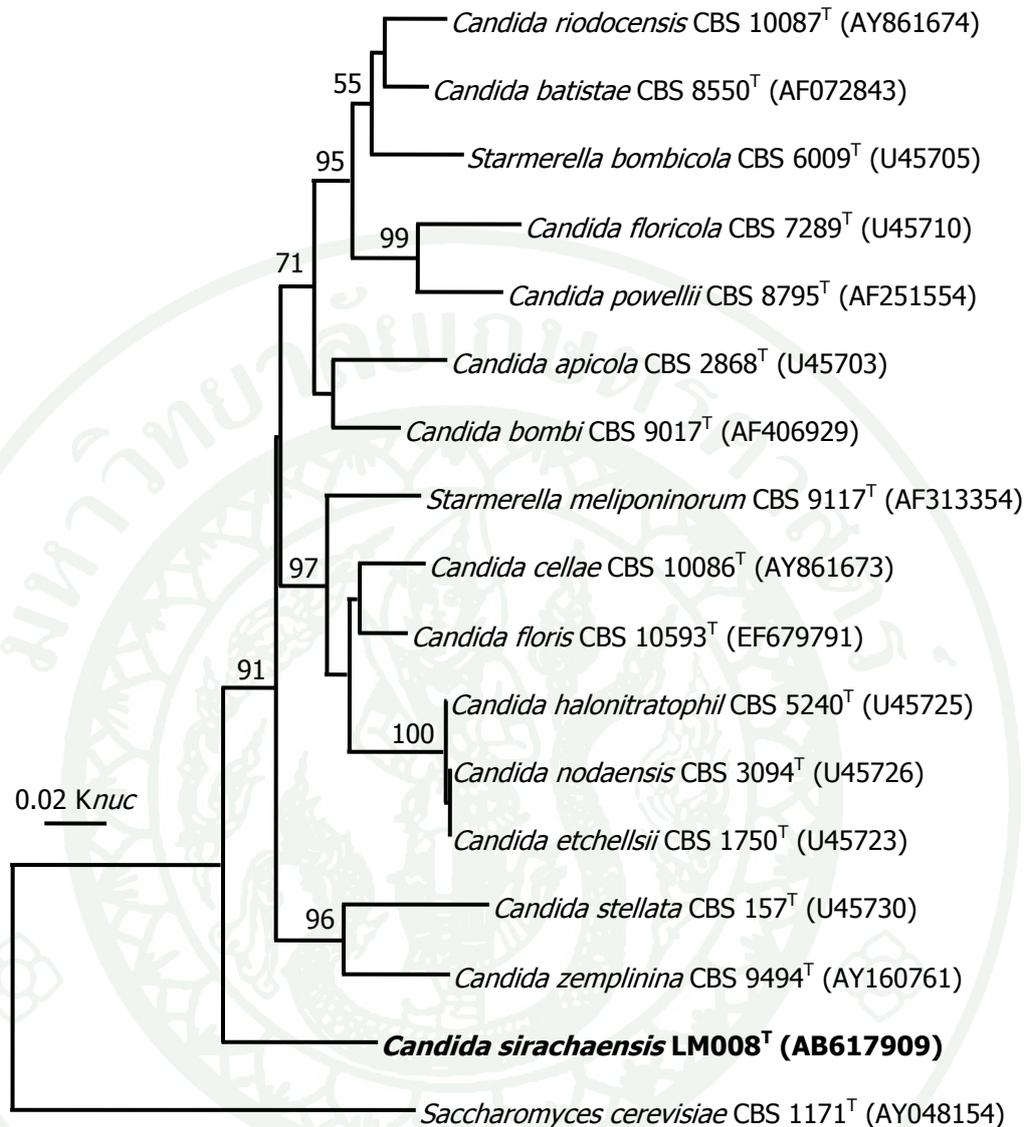
การอธิบายยีสต์สปีชีส์ใหม่ทำโดยศึกษาลักษณะต่างๆ ของยีสต์ ตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานเคมี รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและตั้งชื่อเพื่อเสนอเป็นสปีชีส์ใหม่ ดังนี้

4.1 *Candida sirachaensis* sp. nov. (LM008^T)

สำหรับยีสต์สายพันธุ์ LM008^T เป็นยีสต์ที่แยกจากผิวใบนนทรีป่าซึ่งเก็บจากค่ายลูกเสือวชิราวุธ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี เมื่อวันที่ 26 เมษายน พ.ศ. 2552 (ตารางที่ 4)

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ LM008 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida bombi* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 9.2 เฟอร์เซ็นต์ (45 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 8 ตำแหน่งใน 487 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เฟอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ LM008 และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ายีสต์สายพันธุ์ LM008 อยู่ในตำแหน่งห่างจากยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว โดยไม่อยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับยีสต์สปีชีส์ใดเลย (ภาพที่ 8) ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่ายีสต์สายพันธุ์ LM008 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ LM008 ไม่สร้างแอสโกสปอร์และมีลักษณะฟีโนไทป์ต่างๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida sirachaensis* sp. nov. โดยมีสายพันธุ์ LM008 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “*sirachaensis*” เนื่องจากแยกได้จากผิวใบนนทรีป่าซึ่งเก็บจากค่ายลูกเสือวชิราวุธ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี สำหรับ type strain ได้ฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 12094^T) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 8 ต้นไม้วัดนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ *Candida sirachaensis* sp. nov. (LM008^T) และสปีชีส์ที่สัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และ two-parameter ของ Kimura (1980) ประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ค่า $\text{บาร์} = 0.02 \text{ K nuc}$.

ลักษณะของ *Candida sirachaensis* sp. nov. (LM008^T)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อหมบเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลมถึงรูปไข่มีขนาด 1.5-4 x 2.5-5.5 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 9)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อหมบเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อมีโคโลนีสีขาว รูปร่างกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าโคโลนีเรียบเป็นมันวาว ก่อนข้างนูน

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส ไม่พบการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	S	แลคโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-		

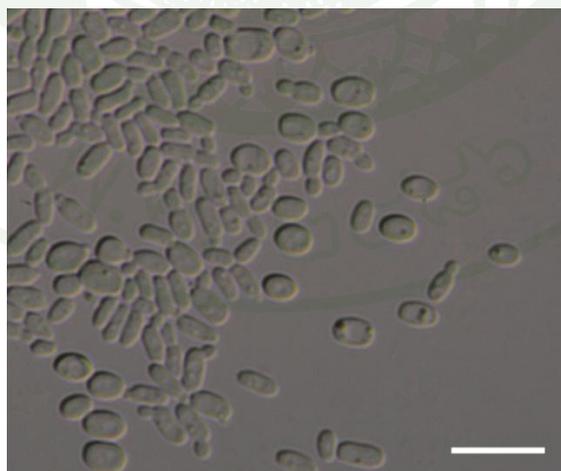
การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	+	กลีเซอรอล	+
ซอร์โบส	+	อิริทริทอล	-
เอ็นอะซีติล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไรบิทอล	W
ดี-ไรโบส	+	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	-	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	-	อินอซิทอล	-

แอล-แรมโนส -		ดี-กลูโคโน-δ-แลกโตน	+
ซูโครส	+	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	S
มอลโทส	+	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	+
ทรีฮาโลส	-	กรดดี-กลูโคนิก	+
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	-	กรดกาแลกตุโรนิก -	
ซาลิซิน	-	กรดแลคติก	-
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	+
ราฟไฟโนส	S	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	-
อินูลิน	-	ไซลิทอล	S
การแอสซิมิเลตสารประกอบในโตรเจน			
แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	+
โซเดียมไนไตรต์	+	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาตาเวอรินไดไฮโดรคลอไรด์	+
ลักษณะอื่นๆ:			
การสร้างกรดจากกลูโคส			+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน			S
การสร้างสารประกอบอะมัลลอยด์ภายนอกเซลล์			-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซีไมด์			-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซีไมด์			-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์			+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์			+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์			+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์			+
การเจริญที่ 20 องศาเซลเซียส			+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส			+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส			+

การเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสไลโคอะโซเนียมบลูปี	-
ชนิดของยูนิตวิโนนหลัก	Q9

Candida sirachaensis sp. nov. สามารถแยกจาก *Candida bombi* (Meyer et al., 1998) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วซึ่งมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงที่สุด โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene, ตำแหน่งบนต้นไม้วิวัฒนาการ, ความสามารถในการหมัก ได้แก่ การหมักกลูโคส, ซูโครส, ทรีฮาโลสและราฟฟิโนส, ความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน ได้แก่ กาแลกโทส, ดี-ไรโบส, มอลโทส, ทรีฮาโลส, ราฟฟิโนส, ไรบิทอล, 2-คีโต-ดี-กลูโคเนตและไซลิทอล, ความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ โปแตสเซียมไนเตรตและโซเดียมไนไตรต์ และลักษณะอื่น ได้แก่ การสร้างกรดจากกลูโคส, การสร้างเส้นใยเทียม, การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์, การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามินและการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส



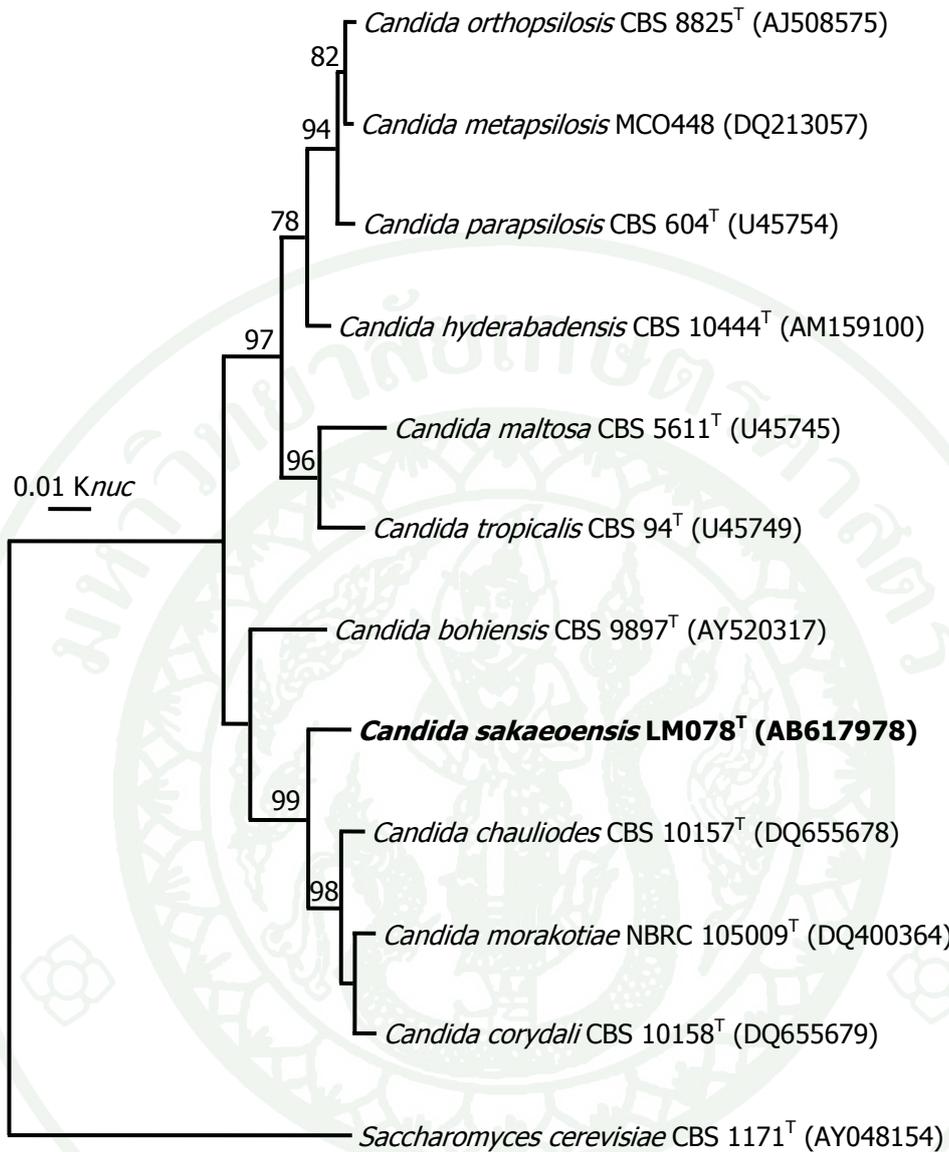
ภาพที่ 9 สัณฐานวิทยาของเซลล์ของ *Candida sirachaensis* sp. nov. (LM008^T) ที่เจริญบนอาหาร YEM broth เป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

4.2 *Candida sakaeoensis* sp. nov. (LM068, LM078^T)

สำหรับยีสต์สายพันธุ์ LM068 เป็นยีสต์ที่แยกจากผิวใบลีลาวดี ซึ่งเก็บจากอ่างเก็บน้ำพระปรง อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว เมื่อวันที่ 11 พฤษภาคม พ.ศ. 2552 และสำหรับยีสต์สายพันธุ์ LM078^T เป็นยีสต์ที่แยกจากผิวใบประดู่ ซึ่งเก็บจากอ่างเก็บน้ำห้วยยาง อำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว เมื่อวันที่ 11 พฤษภาคม พ.ศ. 2552 (ตารางที่ 4)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ LM068 และ LM078 พบว่าเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida morakotiae* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 2.3 เปอร์เซ็นต์ (13 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 2 ตำแหน่งใน 569 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์อยู่ในตำแหน่งห่างจากยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว โดยอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับ *Candida bohiensis* CBS 9897^T, *Candida chauliodes* CBS 10157^T, *Candida morakotiae* NBRC 105009^T และ *Candida corydali* CBS 10158^T (ภาพที่ 10) ดังนั้น จึงเป็นการยืนยันว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นสปีชีส์เดียวกันและจัดเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ LM078 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะฟีโนไทป์ต่างๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida sakaeoensis* sp. nov. โดยมี LM078 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “*sakaeoensis*” เนื่องจากแยกได้จากผิวใบประดู่ซึ่งเก็บจากอำเภอวัฒนานคร จังหวัดสระแก้ว



ภาพที่ 10 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ *Candida sakaeoensis* sp. nov. (LM078^T) และสปีชีส์ที่สัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และ two-parameter ของ Kimura (1980) ประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ = 0.01 Knuc.

ลักษณะของ *Candida sakaeoensis* sp. nov. (LM078^T)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลมถึงรูปไข่มีขนาด 3.5-7 x 3-6.5 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 11A)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า โคลินีสีครีมเนื้อคล้ายเนยเหลว (butyrous) รูปร่างกลม ผิวหน้าเรียบ ขอบเรียบ และ โคลินีเจริญแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ หลังจากบ่มนาน 2 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่ามีการสร้างเส้นใยเทียมแต่ไม่พบการเส้นใยแท้ (ภาพที่ 11B)

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	+	แลคโทส	-
กาแลคโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-		

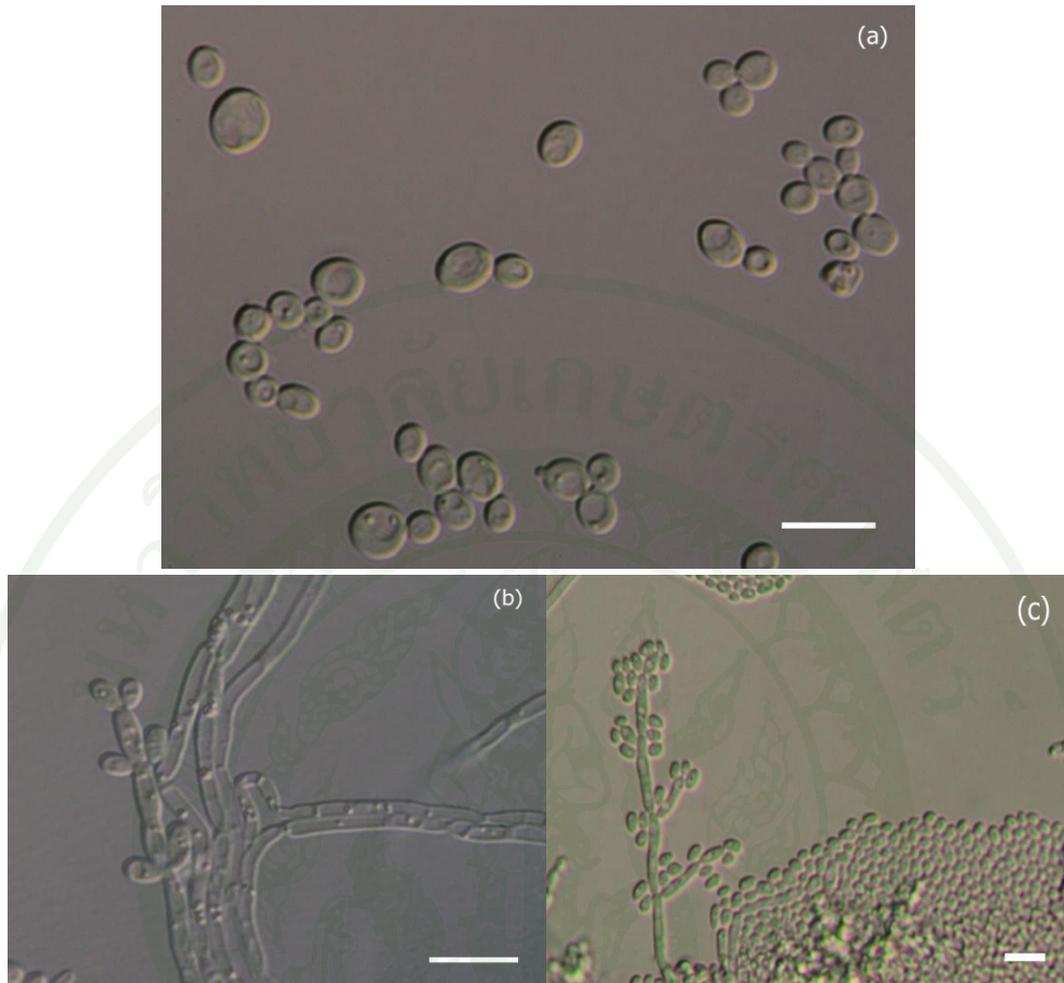
การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลคโทส	+	กลีเซอรอล	+
ซอร์บิต	+	อิริทริทอล	-
เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	+	ไรบิทอล	+
ดี-ไรโบส	-	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	-	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลคทิทอล	-

ดี-อะราบิโนส	-	อินออซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-δ-แลกโตน	+
ซูโครส	-	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	+
มอลโทส	-	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	+
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์	+	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแลกตุโรนิก	-
ซาลิซิน	-	กรดแลคติก	-
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	+
ราฟไฟโนส	-	เมทานอล	-
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	-		
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน			
แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาตาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์	+
ลักษณะอื่นๆ:			
การสร้างกรดจากกลูโคส			+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน			+
การสร้างสารประกอบอะมัลลอยด์ภายนอกเซลล์			-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซิไมด์			-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซิไมด์			-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์			+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์			+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์			+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์			+
การเจริญที่ 20 องศาเซลเซียส			+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส			+

การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโครไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสี่โคอะโซเนียมบลูปี	-

Candida sakaeoensis sp. nov. สามารถแยกจาก *Candida morakotiae* (Nakase *et al.*, 2009) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงที่สุด โดยอาศัยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene, ตำแหน่งบนต้นไม้วิวัฒนาการ, ความสามารถในการหมัก ได้แก่ กาแลกโทสและทรีฮาโลส, ความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน ได้แก่ ดี-ไรโบส, ดี-ไซโลส, แอล-อะราบีโนส, ซูโครส, มอลโทส, เซลโลไบโอส, ซาลิซิน, เมลลิซิโทสและดี-กลูโคโน- δ -แลกโตน และลักษณะอื่น ได้แก่ การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามินและการเจริญที่ 35 และ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 11 สัณฐานวิทยาของเซลล์ของ *Candida sakaeoensis* sp. nov. (LM078^T)

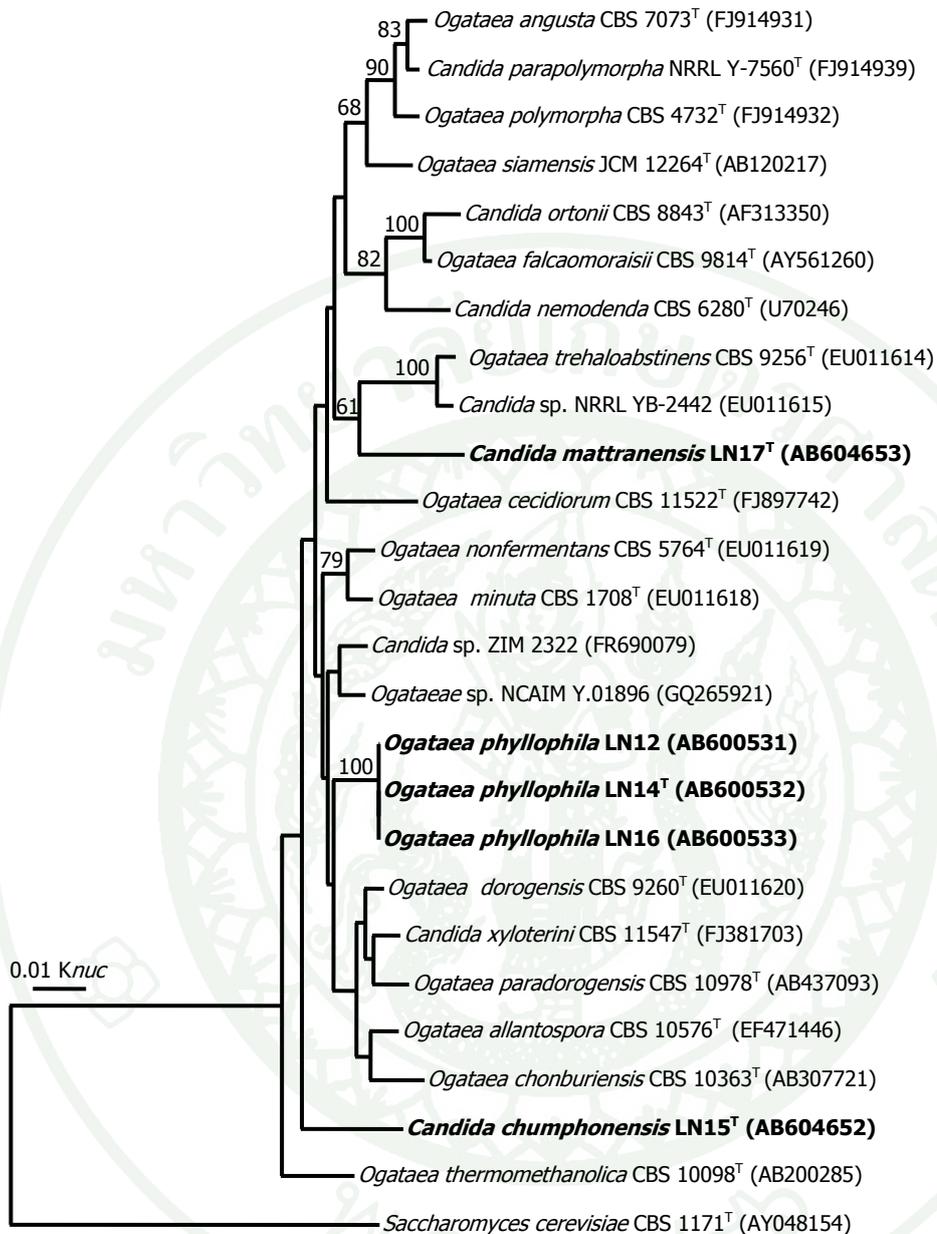
- A. เซลล์ที่เจริญบนอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส
(บาร์ = 10 ไมโครเมตร)
- B. เส้นใยเทียมบนอาหาร corn meal agar หลังบ่ม 2 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส
(บาร์ = 10 ไมโครเมตร)

4.3 *Ogataea phyllophila* sp. nov. (LN12, LN14^T, LN16)

สำหรับยีสต์สายพันธุ์ LN12, LN14^T และ LN16 เป็นเมทิล โลโทรฟิกลีซิสต์ที่แยกจากผิวใบพืช 3 ชนิดที่ไม่รู้ชื่อ ซึ่งเก็บจากเกาะมาตรา จังหวัดชุมพร เมื่อวันที่ 19 พฤษภาคม พ.ศ. 2552 (ตารางที่ 4)

จากการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ LN12, LN14 และ LN16 พบว่าเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Ogataea* sp. NCAIM Y.01896 (GQ265921) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย แต่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ไว้ใน GenBank โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.4 เปอร์เซ็นต์ (9 นิวคลีโอไทด์ ใน 568 นิวคลีโอไทด์) และมี *Ogataea minuta* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วที่ใกล้เคียงที่สุด โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.8 เปอร์เซ็นต์ (10 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 1 ตำแหน่งใน 568 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ในตำแหน่งเดียวกันและห่างจากยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วสปีชีส์อื่น และสร้างคลัสเตอร์กับ *Ogataea nonfermentans* CBS 5764^T, *Ogataea minuta* CBS 1708^T, *Ogataea dorogensis* CBS 9260^T, *Candida xyloferini* CBS 11547^T, *Ogataea paradogensis* CBS 10978^T, *Ogataea allantospora* CBS 10576^T และ *Ogataea chonburiensis* CBS 10363^T (ภาพที่ 12) ดังนั้น จึงเป็นการยืนยันว่ายีสต์ 3 สายพันธุ์เป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกันและเป็นสปีชีส์ใหม่จึงได้ศึกษาเพิ่มเติมและได้เสนอตั้งชื่อและอธิบายโดยการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สร้างแอสโคสปอร์หลังจากบ่ม 3 วัน บนอาหาร YM agar, 5% malt extract และ corn meal agar ทั้งที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส และมีลักษณะฟิโนไทป์ต่างๆ เหมือนสกุล *Ogataea* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Ogataea* และตั้งชื่อเป็น *Ogataea phyllophila* sp. nov. โดยมีสายพันธุ์ LN14 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “*phyllophila*” เนื่องจากทั้ง 3 สายพันธุ์แยกได้จากบนพื้นผิวใบพืช สำหรับ type strain ได้ฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ 3 แห่ง คือ BIOTEC Culture Collection (BCC) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) ประเทศเนเธอร์แลนด์ โดยมี accession number คือ BCC 42666^T, NBRC 107780^T และ CBS 12095^T ตามลำดับ



ภาพที่ 12 ต้นไม้วัดนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ *Ogataea phyllophila* sp. nov.

(LN12, LN14^T และ LN16), *Candida chumphonensis* sp. nov. (LN15^T), *Candida mattranensis* sp. nov. (LN17^T) และสปอร์ที่สัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และ two-parameter ของ Kimura (1980) ประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ = 0.01 K nuc.

ลักษณะของ *Ogataea phyllophila* sp. nov. (LN12, LN14^T, LN16)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อหมบเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชลล์มีรูปร่างรีขนาด 2-3 x 2-4 ไมโครเมตร อยู่เป็นเชลล์เดี่ยว หรือเป็นคู่ เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 13A)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อหมบเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า โคลินีสีครีม เนื้อคล้ายเนยเหลว (butyrous) รูปร่างกลม ผิวหน้าเรียบ ขอบเรียบ และโคลินีเจริญบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar หลังจากหมบ 3 วัน ที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, malt extract agar และ corn meal agar ในทั้งสองอุณหภูมิ โดยพบการสร้างแอสโคสปอร์ 1-4 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส ในขณะที่อยู่สายพันธุ์เดี่ยว (ภาพที่ 13B)

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส ไม่พบการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	-	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-		

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	-	กลีเซอรอล	+
ซอร์บอส	+	อิริทริทอล	+
เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไรบิทอล	+
ดี-ไรโบส	+	ดี-กลูซิทอล	+

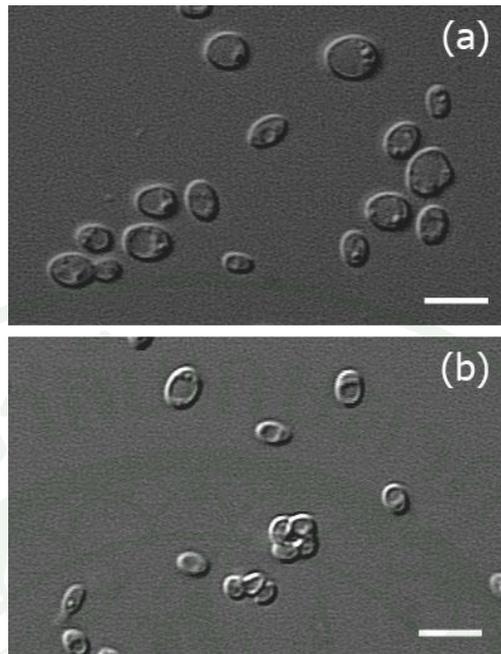
ดี-ไซโคลส	S	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล -	
ดี-อะราบิโนส	W	อินอซิทอล -	
แอล-แรมโนส -		ดี-กลูโคโน-δ-แลกโตน	+
ซูโครส	-	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	W
มอลโทส	-	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	+
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	-
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซค์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแลกตุโรนิก -	
ซาลิซิน	+	กรดแลคติก	W
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	+
แลกโทส	-	กรดซิตริก	+
ราฟไฟโนส -		เมทานอล	+
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	-	ไซลิทอล	+
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน			
แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	+
โซเดียมไนไตรต์	+	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาตาเวอรินไดไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	-
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	W
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิมิด	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิมิด	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	-

การเจริญที่ 15 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสตีโคอะโซเนียมบลูปี	-
ชนิดของยูนีควิโนนหลัก	Q7

Ogataea phyllophila sp. nov. สามารถแยกจาก *Ogataea minuta* (Kurtzman, 1998) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วซึ่งมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงที่สุด โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene, ตำแหน่งบนต้นไม้วิวัฒนาการ, ความสามารถในการหมัก ได้แก่ ทรีฮาโลส, ความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน ได้แก่ ซอร์โบส, ดี-ไซโลส, อิริทริทอล, 2-คีโต-ดี-กลูโคเนต, 5-คีโต-ดี-กลูโคเนตและกรดแลคติก และลักษณะอื่น ได้แก่ การเจริญใน 0.01 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิไมด์, การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์และการเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน



ภาพที่ 13 สัณฐานวิทยาของเซลล์ของ *Ogataea phyllophila* sp. nov. (LN14^T)

A. เซลล์ที่เจริญบนอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 5 ไมโครเมตร)

B. แอสโคสปอร์บนอาหาร corn meal agar หลังบ่ม 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 5 ไมโครเมตร)

4.4 *Candida chumphonensis* sp. nov. (LN15^T)

สำหรับยีสต์สายพันธุ์ LN15^T เป็นเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่แยกจากผิวใบพืชที่ไม่รู้ชื่อซึ่งเก็บจากเกาะมาตรา จังหวัดชุมพร เมื่อวันที่ 19 พฤษภาคม พ.ศ. 2552 (ตารางที่ 4)

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ LN15 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida* sp. ZIM 2322 ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย แต่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ไว้ใน GenBank แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 2.8 เบอ์เซ็นต์ (18 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 2 ตำแหน่งใน 570 นิวคลีโอไทด์) และมี *Ogataea dorogensis* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วที่ใกล้เคียงที่สุด โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 3.2 เบอ์เซ็นต์ (18 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 3 ตำแหน่งใน 570 นิวคลีโอไทด์)

โอโทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ LN15 และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ายีสต์สายพันธุ์ LN15 อยู่ในตำแหน่งห่างจากยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว โดยไม่อยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับยีสต์สปีชีส์ใดเลย (ภาพที่ 12) ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่ายีสต์สายพันธุ์ LN15 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่จึงได้ศึกษาเพิ่มเติมและได้เสนอตั้งชื่อและอธิบายโดยการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ LN15 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะฟีโนไทป์ต่างๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida chumphonensis* sp. nov. โดยมี LN15 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “*chumphonensis*” เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างใบพืชบนเกาะมาตรา จังหวัดชุมพร สำหรับ type strain ได้ฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ 3 แห่ง คือ BIOTEC Culture Collection (BCC) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) ประเทศเนเธอร์แลนด์ โดยมี accession number คือ BCC 42667^T, NBRC 107781^T และ CBS 12096^T ตามลำดับ

ลักษณะของ *Candida chumphonensis* sp. nov. (LN15^T)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลมถึงรูปไข่มีขนาด 2.0-4.0 x 2.0-4.0 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 14)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อมีโคโลนีสีครีม รูปร่างกลม ขอบโคโลนีเป็นแบบ undulate ผิวหน้าโคโลนีเป็นแบบ umbonate

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส ไม่พบการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	S	แล็กโทส	-
กาแล็กโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-		

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแล็กโทส	-	กลีเซอรอล	W
ซอร์โบส	-	อิริทริทอล	W
เอ็นอะซิติก-ดี-กลูโคซามีน	-	ไรบิทอล	W
ดี-ไรโบส	W	ดี-กลูซิทอล	W
ดี-ไซโลส	-	ดี-แมนนิทอล	W
แอล-อะราบีโนส	-	กาแล็กทิทอล	-
ดี-อะราบีโนส	-	อินออซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-δ-แล็กโตน	-
ซูโครส	-	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	w
มอลโทส	-	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	+
ทรีฮาโลส	-	กรดดี-กลูโคนิก	W
แอลฟามेतิล-ดี-กลูโคไซค์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	W	กรดกาแล็กตูโรนิก	-
ซาลิซิน	W	กรดแลคติก	-
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	W
แล็กโทส	-	กรดซิตริก	-
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	+
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	W
อินูลิน	W	ไซลิทอล	W

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

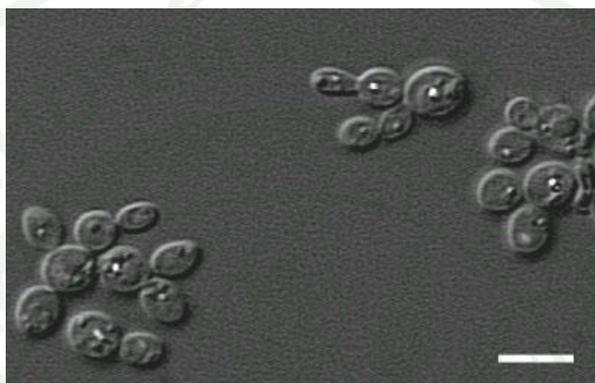
แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	-
โซเดียมไนไตรต์	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	-	คาตาเวอรินไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	-
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	W
การสร้างสารประกอบอะมัลลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซิไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคเลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะโซเนียมบลูปี	-
ชนิดของยูนิกวิโนนหลัก	Q7

Candida chumphonensis sp. nov. สามารถแยกจาก *Ogataea dorogensis* (Peter et al., 2003) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วซึ่งมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงที่สุด โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene, ตำแหน่งบนต้นไม้วิวัฒนาการ, ความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน ได้แก่ ซอร์บอส, ดี-ไรบอส, ดี-ไซโลส,

แอล-อะราบีโนส, ดี-อะราบีโนส, ทรีฮาโลส, เซลโลไบโอส, ซาลิซิน, อินูลิน, กลีเซอรอล, อิริทรีทอล, ไรบิทอล, ดี-กลูซิทอล, ดี-แมนนิทอล, 2-ดี-ดี-ดี-กลูโคเนต, กรดดี-กลูโคนิก, กรดซัคซินิก, กรดซิตริกและเอทานอล, ความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ แอล-ไลซีน และลักษณะอื่น ได้แก่ การเจริญที่ 37 และ 40 องศาเซลเซียส, การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซิไมด์และการเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน



ภาพที่ 14 สัณฐานวิทยาของเซลล์ของ *Candida chumphonensis* sp. nov. (LN15^T) ที่เจริญบนอาหาร YM broth เป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 5 ไมโครเมตร)

4.5 *Candida mattranensis* sp. nov. (LN17^T)

สำหรับยีสต์สายพันธุ์ LN17^T เป็นเมทิลโลโทรฟิยีสต์ที่แยกจากผิวใบพืชที่ไม่รู้ชื่อซึ่งเก็บจาก เกาะมาตรา จังหวัดชุมพร เมื่อวันที่ 19 พฤษภาคม พ.ศ. 2552 (ตารางที่ 4)

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ LN17 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida* sp. NRRL YB-2442 ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย แต่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ไว้ใน GenBank โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 3.5 เปอร์เซ็นต์ (20 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 1 ตำแหน่งใน 566 นิวคลีโอไทด์) และใกล้เคียงที่สุดกับสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว คือ *Ogataea cecidiorum* โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 3.7 เปอร์เซ็นต์ (21 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 1 ตำแหน่งใน 566 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจาก

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ LN17 และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ายีสต์สายพันธุ์ LN17 อยู่ในตำแหน่งห่างจากยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้วที่ใกล้เคียงที่สุด โดยอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกันกับ *Ogataea angusta* CBS 7073^T, *Candida parapolyomorpha* NRRL Y-7560^T, *Ogataea polymorpha* CBS 4732^T, *Ogataea siamensis* JCM 12264^T, *Candida ortonii* CBS 8843^T, *Ogataea falcaomoraisii* CBS 9814^T, *Candida nemodenda* CBS 6280^T, *Ogataea trehaloabstinens* CBS 9256^T และ *Ogataea cecidiorum* CBS 11522^T (ภาพที่ 12) ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่ายีสต์สายพันธุ์ LN17 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่จึงได้ศึกษาเพิ่มเติมเสนอตั้งชื่อและอธิบายโดยการตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ LN17 ไม่สร้างแอสโคสปอร์ทั้งที่อยู่สายพันธุ์เดี่ยวและผสมเป็นคู่กับสายพันธุ์อื่น และมีลักษณะฟีโนไทป์ต่างๆ เหมือนสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida mattranensis* sp. nov. โดยมี LN17 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “mattranensis” เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างใบพืชบนเกาะมาตรา จังหวัดชุมพร สำหรับ type strain ได้ฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ 3 แห่ง คือ BIOTEC Culture Collection (BCC) ประเทศไทย, NITE Biological Resources Center (NBRC) ประเทศญี่ปุ่น และ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) ประเทศเนเธอร์แลนด์ โดยมี accession number คือ BCC 42668^T, NBRC 107782^T และ CBS 12097^T ตามลำดับ

ลักษณะของ *Candida mattranensis* sp. nov. (LN17^T)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลมถึงรูปไข่มีขนาด 1.0-4.0 x 2.0-5.0 ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวและเปนครู มีการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 15)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อมีโคโลนีสีครีม รูปร่างกลม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์ทั้งที่อยู่สายพันธุ์เดี่ยวและผสมเป็นคู่กับสายพันธุ์อื่น

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส ไม่พบการสร้างทั้งเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	W	แล็กโทส	-
กาแล็กโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-		

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแล็กโทส	W	กลีเซอรอล	+
ซอร์โบส	S	อิริทริทอล	+
เอ็นอะซิติก-ดี-กลูโคซามีน	-	ไรบิทอล	+
ดี-ไรโบส	S	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-ไซโลส	W	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบีโนส	-	กาแล็กทิทอล	+
ดี-อะราบีโนส	-	อินออซิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-δ-แล็กโตน	+
ซูโครส	-	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
มอลโทส	-	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	-
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	-
แอลฟามेतิล-ดี-กลูโคไซค์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแล็กตุโรนิก	-
ซาลิซิน	+	กรดแลคติก	W
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	+
แล็กโทส	-	กรดซิตริก	+
ราฟฟิโนส	-	เมทานอล	+
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	-	ไซลิทอล	+

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

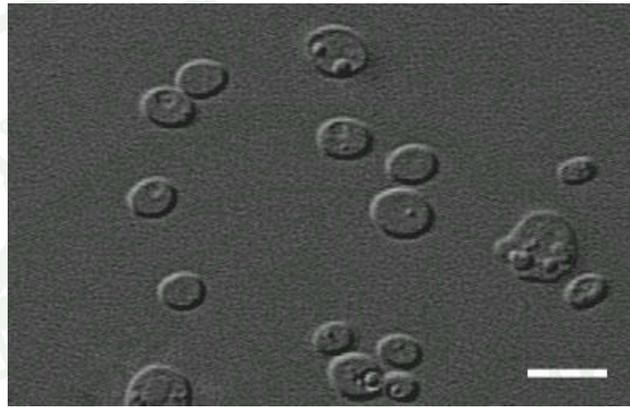
แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	+
โซเดียมไนไตรต์	+	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาตาเวอรินไดไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	-
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซิไมด์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญที่ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสไลโคโซเนียมบลูปี	-
ชนิดของยูนิติวินอนหลัก	Q7

Candida mattranensis sp. nov. สามารถแยกจาก *Ogataea cecidiorum* (Glushakova et al., 2010) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงที่สุด โดยอาศัยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene, ตำแหน่งบนต้นไม้วิวัฒนาการ,

ความสามารถในการหมัก ได้แก่ กลูโคส, ความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน ได้แก่ กาแลกโทส, ซอร์โบส, ดี-ไรโบส, แอล-แรมโนส, แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์, เซลโลไบโอส, กรดแลคติกและกรดซิตริก และลักษณะอื่น ได้แก่ การเจริญใน 0.01 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์, การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์, การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับ โซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์และการเจริญที่ 35 และ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 15 ลักษณะวิทยาของเซลล์ของ *Candida mattranensis* sp. nov. (LN17^T) ที่เจริญบนอาหาร YM broth เป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 5 ไมโครเมตร)

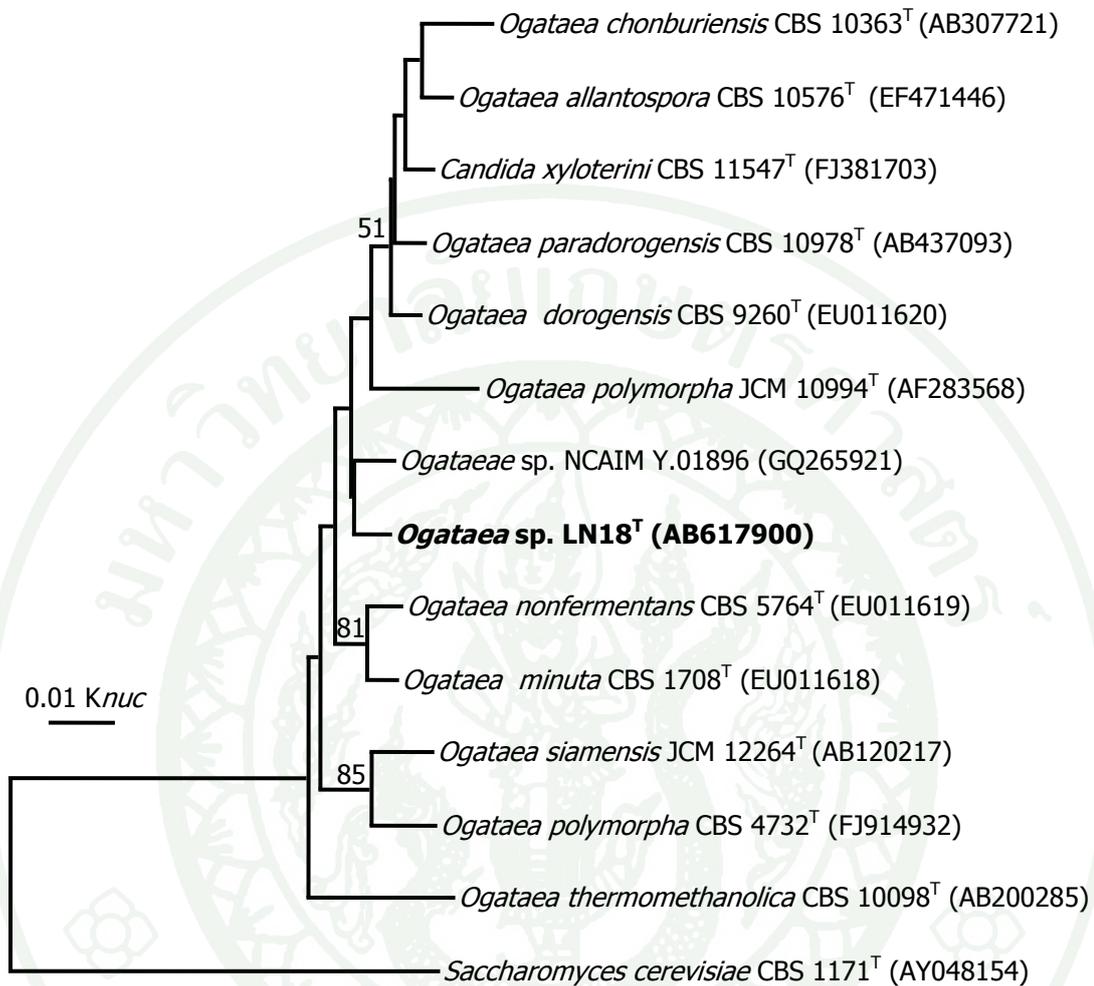
4.6 *Ogataea* sp. LN18^T (LN18^T)

สำหรับยีสต์สายพันธุ์ LN18^T เป็นเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่แยกจากผิวใบพืชที่ไม่รู้ชื่อซึ่งเก็บจากเกาะมาตรา จังหวัดชุมพร เมื่อวันที่ 19 พฤษภาคม พ.ศ. 2552 (ตารางที่ 4)

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ LN18 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Ogataea* sp. NCAIM Y.01896 ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย แต่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene ไว้ใน GenBank แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.2 เปอร์เซ็นต์ (7 นิวคลีโอไทด์ และมีช่องว่าง 1 ตำแหน่ง ใน 566 นิวคลีโอไทด์) และมี *Ogataea minuta* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วที่ใกล้เคียงที่สุด โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 1.6 เปอร์เซ็นต์ (9 นิวคลีโอไทด์ ใน 568 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่จะจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ได้ เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2

ของ LSU rRNA gene ของยีสต์สายพันธุ์ LN18 และยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ายีสต์สายพันธุ์ LN18 อยู่ในตำแหน่งห่างจากยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว โดยอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกับ *Ogataea chonburiensis* CBS 10363^T, *Ogataea allantospora* CBS 10576^T, *Candida xylosterini* CBS 11547^T, *Ogataea paradorogensis* CBS 10978^T, *Ogataea dorogensis* CBS 9260^T, *Ogataea polymorpha* JCM 10994^T, *Ogataea nonfermentans* CBS 5764^T และ *Ogataea minuta* CBS 1708^T (ภาพที่ 16) ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันว่ายีสต์สายพันธุ์ LN18 เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

จากการศึกษาลักษณะตามเกณฑ์อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม และอนุกรมวิธานเคมี พบว่ายีสต์สายพันธุ์ LN18 สร้างแอสโคสปอร์ และมีลักษณะฟีโนไทป์ต่างๆ เหมือนสกุล *Ogataea* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของ *Ogataea* สำหรับ type strain ได้ฝากเก็บที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS 12098^T) ประเทศเนเธอร์แลนด์



ภาพที่ 16 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์สายพันธุ์ *Ogataea* sp. LN18 (LN18^T) และ สปีชีส์ที่สัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene โดยใช้ neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และ two-parameter ของ Kimura (1980) ประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ = 0.01 Knuc.

ลักษณะของ *Ogataea* sp. LN18 (LN18^T)

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เชลลมีรูปร่างรี ขนาด 1-3 x 1-3.5 ไมโครเมตร อยู่เป็นเชลลเดี่ยว หรือเป็นคู่ เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (ภาพที่ 17A)

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า โคลินีสีครีมเนื้อคล้ายเนยเหลว (butyrous) รูปร่างกลม ผิวหน้าเรียบ ขอบเรียบ และโคลินีเจริญบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, acetate agar, malt extract agar, corn meal agar และ Gorodkova agar หลังจากบ่ม 3 วัน ที่ 15 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่าสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร YM agar, malt extract agar และ corn meal agar ในทั้งสองอุณหภูมิ โดยพบการสร้างแอสโคสปอร์ 1-4 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส ในขณะที่อยู่สายพันธุ์เดี่ยว (ภาพที่ 17B)

การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร corn meal agar ด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อบนสไลด์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส ไม่พบการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การหมักคาร์โบไฮเดรต

กลูโคส	-	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-		

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

กลูโคส	+	แป้ง	-
กาแลกโทส	-	กลีเซอรอล	+
ซอร์บอส	+	อิริทริทอล	+
เอ็นอะซิดิล-ดี-กลูโคซามีน	-	ไรบิทอล	+
ดี-ไรโบส	+	ดี-กลูซิทอล	+

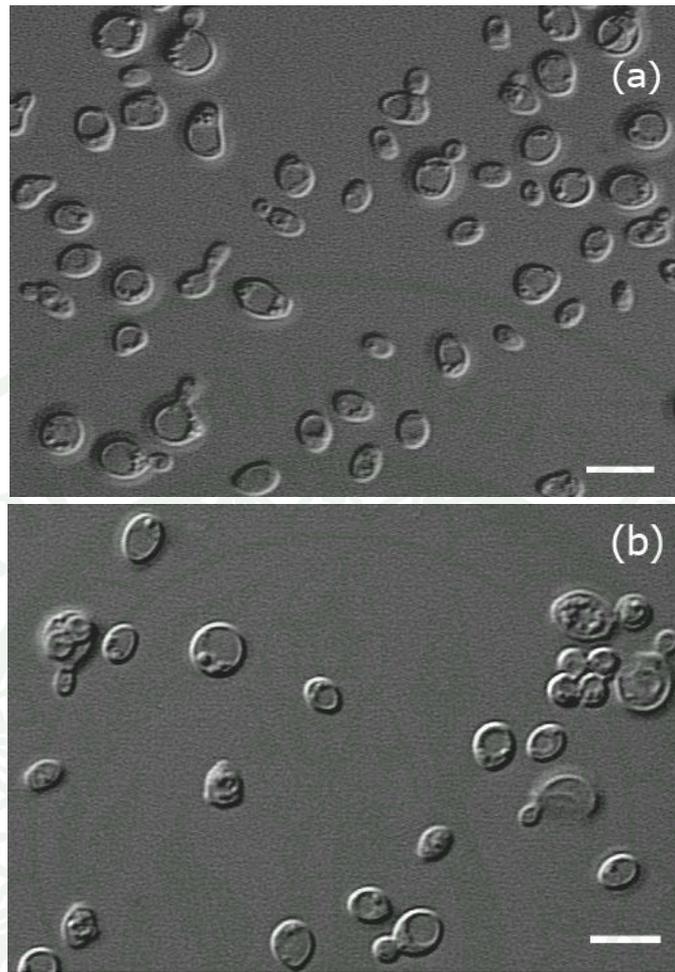
ดี-ไซโคลส	S	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล -	
ดี-อะราบิโนส	W	อินอซิทอล -	
แอล-แรมโนส -		ดี-กลูโคโน-δ-แลกโตน	+
ซูโครส	-	2-คีโต-ดี-กลูโคเนต	W
มอลโทส	-	5-คีโต-ดี-กลูโคเนต	+
ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กลูโคนิก	-
แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซค์	-	กรดดี-กลูโคโรนิก	-
เซลโลไบโอส	+	กรดกาแลกตุโรนิก	-
ซาลิซิน	+	กรดแลคติก	W
เมลลิไบโอส	-	กรดซัคซินิก	S
แลกโทส	-	กรดซิตริก	+
ราฟไฟโนส -		เมทานอล	S
เมลลิซิโทส	-	เอทานอล	+
อินูลิน	-	ไซลิทอล	+
การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน			
แอมโมเนียมซัลเฟต	+	โปแตสเซียมไนเตรต	+
โซเดียมไนไตรต์	+	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
แอล-ไลซีน	+	คาตาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การสร้างกรดจากกลูโคส	+
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	W
การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ภายนอกเซลล์	-
การเจริญใน 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิมิด	-
การเจริญใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไซโคลเฮกซิมิด	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์	-
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์	+
การเจริญบนอาหารกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์	-

การเจริญที่ 20 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 25 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	+
การเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 42 องศาเซลเซียส	-
การเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส	-
การไฮโดรไลซ์ยูเรีย	-
การทำปฏิกิริยากับสตีโคอะโซเนียมบลูปี	-
ชนิดของยูนีควิโนนหลัก	Q6

Ogataea sp. LN18 สามารถแยกจาก *Ogataea minuta* (Kurtzman, 1998) ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้ว ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงที่สุด โดยอาศัยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene, ตำแหน่งบนต้นไม้วิวัฒนาการ, ความสามารถในการหมัก ได้แก่ ทริฮาโลส, ความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน ได้แก่ ซอร์โบส, อิริทริทอล, 2-คีโต-ดี-กลูโคเนต, 5-คีโต-ดี-กลูโคเนตและกรดแลคติก และลักษณะอื่น ได้แก่ การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน, การเจริญใน 0.01 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ โซโคลเฮกซีไมด์, การเจริญบนอาหารกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบยูนีควิโนน



ภาพที่ 17 สัณฐานวิทยาของเซลล์ของ *Ogataea* sp. LN18 (LN18^T)

A. เซลล์ที่เจริญบนอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส
(บาร์ = 5 ไมโครเมตร)

B. แอสโคสปอร์บนอาหาร corn meal agar หลังบ่ม 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส
(บาร์ = 5 ไมโครเมตร)

5. ความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบพืชในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยทั้ง 20 แห่ง

ผลการศึกษาความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบพืชในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยทั้ง 20 แห่ง พบว่า

1. สายพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นยีสต์สปิซิส์ที่มีการอธิบายแล้วซึ่งส่วนใหญ่เป็นแอสโคมัซซีตัส ยีสต์โดยพบมากถึง 100 สายพันธุ์ (68.5 เปอร์เซ็นต์) ใน 14 สกุล 36 สปีซิส์ (ตารางที่ 15) ได้แก่

Candida amphixiae (2 สายพันธุ์), *C. apicola* (1 สายพันธุ์), *C. etchellsii* (1 สายพันธุ์), *C. glabrata* (7 สายพันธุ์), *C. jaroonii* (1 สายพันธุ์), *C. maltosa* (5 สายพันธุ์), *C. metapsilosis* (1 สายพันธุ์), *C. nivariensis* (5 สายพันธุ์), *C. nodaensis* (1 สายพันธุ์), *C. parapsilosis* (1 สายพันธุ์), *C. potacharoeniae* (1 สายพันธุ์), *C. rugosa* (6 สายพันธุ์), *C. sorboxylosa* (1 สายพันธุ์), *C. stigmatis* (1 สายพันธุ์), *C. tropicalis* (14 สายพันธุ์), *C. trypodendroni* (1 สายพันธุ์), *Clavispora lusitaniae* (1 สายพันธุ์), *Debaryomyces nepalensis* (9 สายพันธุ์), *Hanseniaspora guilliermondii* (2 สายพันธุ์), *H. opuntiae* (4 สายพันธุ์), *H. thailandica* (3 สายพันธุ์), *Hyphopichia burtonii* (4 สายพันธุ์), *Kazachstania siamensis* (2 สายพันธุ์), *Kluyveromyces marxianus* (1 สายพันธุ์), *K. thermotolerans* (1 สายพันธุ์), *Kodamaea ohmeri* (6 สายพันธุ์), *Metschnikowia koreensis* (1 สายพันธุ์), *Meyerozyma guilliermondii* (1 สายพันธุ์), *Ogataea polymorpha* (1 สายพันธุ์), *P. galeiformis* (2 สายพันธุ์), *P. kudriavzevii* (7 สายพันธุ์), *P. rhodanensis* (1 สายพันธุ์), *Starmerella meliponinorum* (2 สายพันธุ์), *Torulaspota delbrueckii* (1 สายพันธุ์), *T. pretoriensis* (1 สายพันธุ์) และ *Wickerhamomyces edaphicus* (1 สายพันธุ์) และพบแบคทีเรียโอมัยซีตัสยีสต์ 8 สายพันธุ์จาก 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Pseudozyma aphidis* (1 สายพันธุ์), *Sporidiobolus ruineniae* (1 สายพันธุ์), *Trichosporon asahii* (3 สายพันธุ์), *T. mucoides* (1 สายพันธุ์) และ *T. mycotoxinivorans* (2 สายพันธุ์) และสปีชีส์ที่จัดเป็นรากล้ายีสต์ 1 สปีชีส์ คือ *Aureobasidium pullulans* (12 สายพันธุ์)

2. สายพันธุ์ที่เหมือนกับยีสต์สปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 5 สายพันธุ์ โดยเป็นสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. 05-7-186T (2 สายพันธุ์) สายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Geotrichum* sp. SKK15 (1 สายพันธุ์) สายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Pichia* sp. ST-335 (1 สายพันธุ์) และสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Wickerhamia* sp. ST-122 (1 สายพันธุ์)

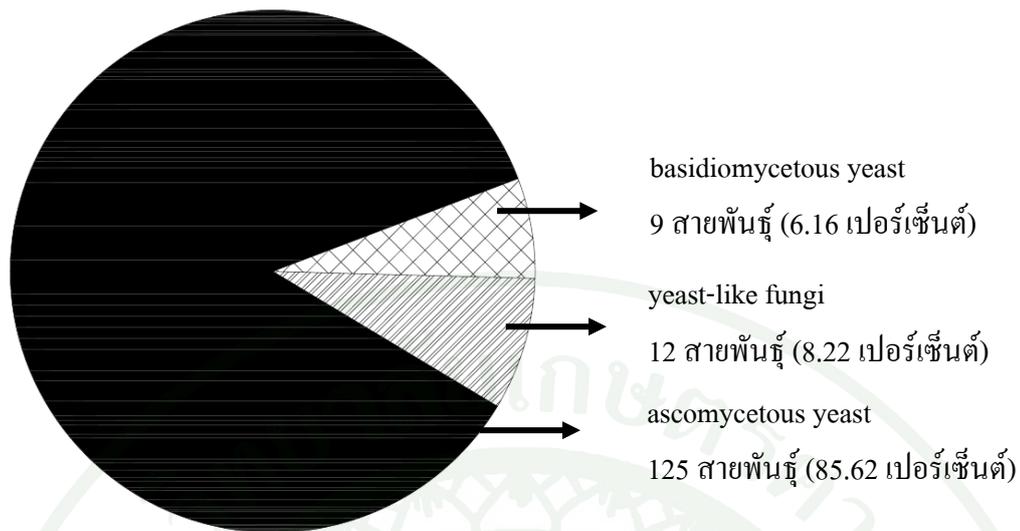
3. สายพันธุ์ที่อาจเป็นยีสต์สปีชีส์ที่มีการอธิบายแล้วหรือยีสต์สปีชีส์ใหม่ 12 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย แอสโคไมซีตัสยีสต์ 6 สปีชีส์ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *Candida sojae* (1 สายพันธุ์), *Meyerozyma guilliermondii* (5 สายพันธุ์), *Ogataea allantospora* (1 สายพันธุ์), *Ogataea siamensis* (1 สายพันธุ์), *Pichia myanmaensis* (2 สายพันธุ์), *Pichia spartinae* (1 สายพันธุ์) และแบคทีเรียโอมัยซีตัสยีสต์ 1 สปีชีส์ คือ *Trichosporon mycotoxinivorans* (1 สายพันธุ์)

4. สายพันธุ์ที่เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 9 สายพันธุ์ใน 6 สปีชีส์ ซึ่งเป็นแอสโคไมซีตัสยีสต์ทั้งหมด คือ *Candida chumphonensis* sp. nov. (1 สายพันธุ์), *Candida mattranensis* sp. nov. (1 สายพันธุ์)

พันธุ์), *Candida sakaeensis* sp. nov. (2 สายพันธุ์), *Candida sirachaensis* sp. nov. (1 สายพันธุ์), *Ogataea phyllophila* sp. nov. (3 สายพันธุ์), และ *Ogataea* sp. LN18 (1 สายพันธุ์)

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่า *C. tropicalis* เป็นยีสต์สปีชีส์ที่พบบ่อยที่สุด คือ พบถึง 14 สายพันธุ์ จาก 146 สายพันธุ์ที่ศึกษา (9.6 เปอร์เซ็นต์) ยีสต์สปีชีส์ที่พบมารองลงมาคือ *C. glabata*, *D. nepalensis* และ *P. kudriavzevii* ซึ่งทั้ง 3 สปีชีส์พบมากถึง 7 สายพันธุ์ ส่วนสปีชีส์ที่พบเพียง 1 สายพันธุ์ มีถึง 35 สปีชีส์ ในขณะที่ราคล้ายยีสต์ คือ *A. pullulans* พบมากถึง 12 สายพันธุ์ (8.2 เปอร์เซ็นต์)

จากผลการแยกทั้งยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิเคียสทั้งหมดจากตัวอย่างจำนวน 97 ตัวอย่าง พบว่า แยกได้แอสโคไมซ์ยีสต์จำนวน 125 สายพันธุ์ (85.62 เปอร์เซ็นต์) แบสิดิโอไมซ์ยีสต์จำนวน 9 สายพันธุ์ (6.16 เปอร์เซ็นต์) และราคล้ายยีสต์จำนวน 12 สายพันธุ์ (8.22 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงในภาพที่ 18 แสดงให้เห็นได้ว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่แยกได้จากผิวใบพืชในประเทศไทยในครั้งนี้ เป็นแอสโคไมซ์ยีสต์มากกว่าแบสิดิโอไมซ์ยีสต์ แต่จากผลการศึกษาในพื้นที่อื่นๆ ของโลกกลับพบว่า ยีสต์บนผิวใบพืชส่วนใหญ่มักเป็นแบสิดิโอไมซ์ยีสต์มากกว่าแอสโคไมซ์ยีสต์ (Fonseca and Inacio, 2006) เช่น ในการศึกษาของ Golubev and Sampaio (2009) ได้แยกยีสต์จากผิวใบของเฟิร์นในประเทศรัสเซียพบว่า แยกได้ยีสต์สกุล *Cryptococcus* ซึ่งเป็นแบสิดิโอไมซ์ยีสต์เป็นจำนวนมากและยังพบ *Cryptococcus* ที่เป็นสายพันธุ์ใหม่อีกด้วย ตัวอย่างสปีชีส์ที่พบคือ *Cryptococcus cylindricus*, *C. silvicola*, *C. pinus*, *C. podzolicus*, *C. filicatus* var. *filicatus* และ *C. filicatus* var. *pelliculosus* การศึกษาของ Golubev et al. (2007) ได้แยกยีสต์จากผิวใบหญ้าในประเทศรัสเซียเช่นกันพบว่า แยกได้ยีสต์สกุล *Pseudozyma* ที่เป็นสายพันธุ์ใหม่คือ *Pseudozyma graminicola* ส่วน Weber et al. (2008) ได้แยกยีสต์จากพื้นผิวใบยูคาลิปตัสในประเทศชิลีพบว่า แยกได้ยีสต์สกุล *Xanthophyllomyces* sp. ซึ่งยีสต์ทั้ง 3 สกุลนั้นล้วนเป็นแบสิดิโอไมซ์ยีสต์ ดังนั้น จากผลการรายงานที่แสดงว่ายีสต์บนผิวใบพืชส่วนใหญ่เป็นแบสิดิโอไมซ์ยีสต์ สาเหตุหนึ่งน่าจะเป็นเพราะแบสิดิโอไมซ์ยีสต์เป็นยีสต์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจึงพบได้มากในพื้นที่ที่มีอุณหภูมิต่ำตลอดปีมากกว่า ในขณะที่ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนซึ่งมีอุณหภูมิก่อนข้างสูงอยู่ตลอดทั้งปี ยีสต์ที่พบจึงเป็นพวกแอสโคไมซ์ยีสต์มากกว่าที่ชอบหรือทนอุณหภูมิก่อนข้างสูง นอกจากนั้นการแยกเชื้อโดยวิธี enrichment โดยการบ่มที่อุณหภูมิก่อนในประเทศไทย ที่เป็นอุณหภูมิก่อนข้างสูงอาจจะส่งเสริมการเจริญเฉพาะยีสต์ที่ชอบหรือทนอุณหภูมิก่อนข้างสูง ทำให้มีโอกาสในการแยกออกมาได้มากกว่า จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ในการทดลองนี้พบแอสโคไมซ์ยีสต์มากกว่าแบสิดิโอไมซ์ยีสต์ก็เป็นได้



ภาพที่ 18 แสดงจำนวนของแอสโคไมซีตัสยีสต์, เบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ และรากล้ายีสต์ที่แยกได้จากผิวใบพืช

นอกจากแอสโคไมซีตัสยีสต์และเบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ที่แยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้แล้วยังพบรากล้ายีสต์อีก คือ *Aureobasidium pullulans* (12 สายพันธุ์) (ภาพที่ 18) ที่พบจำนวนมากรองจากยีสต์สปีชีส์ที่พบมากที่สุดคือ *Candida tropicalis* (14 สายพันธุ์) ซึ่งหากเปรียบเทียบกับเบสิดิโอไมซีตัสยีสต์แล้ว พบมากกว่าเบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสำหรับผลการแยกได้รากล้ายีสต์นี้สอดคล้องกับการรายงานของ McCormack *et al.* (1994) ที่แสดงว่า รากล้ายีสต์ที่แยกได้จากผิวใบพืชที่พบบ่อยที่สุด คือ *Aureobasidium pullulans* ดังนั้น จากผลดังกล่าวนี้อาจแสดงให้เห็นความเป็นไปได้ว่า *Aureobasidium pullulans* และผิวใบพืชน่าจะมีความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกัน

สำหรับตัวอย่างที่แยกเมทิลโทโรฟิกยีสต์ 7 สปีชีส์ได้นั้น ตัวอย่างส่วนใหญ่ยังแยกยีสต์ชนิดอื่นๆ ได้ด้วย มีเพียงตัวอย่างเดียวที่ไม่พบยีสต์ชนิดอื่นอยู่ด้วย โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. *Ogataea allantospora* (1 สายพันธุ์) แยกได้จากตัวอย่างใบชบา ซึ่งเก็บจากค่ายลูกเสือวชิราวุธ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี และในตัวอย่างเดียวกันนี้ยังแยกได้ *Candida glabrata* (1 สายพันธุ์)

2. *Ogataea siamensis* (1 สายพันธุ์) แยกได้จากตัวอย่างใบปาล์มซึ่งเก็บจากปากแม่น้ำชุมพร จังหวัดชุมพร และในตัวอย่างเดียวกันนี้ยังแยกได้ *Debaryomyces nepalensis* (1 สายพันธุ์) และ *Kodamaea ohmeri* (1 สายพันธุ์)

3. *Ogataea phyllophila* sp. nov. 3 สายพันธุ์ แยกได้จากตัวอย่างใบพืชที่ไม่รู้ชื่อบนเกาะมาตรา จังหวัดชุมพร 3 ชนิดโดยตัวอย่างแรกที่แยกได้ *Ogataea phyllophila* sp. nov. ยังแยกได้ *Candida parapsilosis* (1 สายพันธุ์), *Debaryomyces nepalensis* (1 สายพันธุ์) และ *Hanseniaspora thailandica* (1 สายพันธุ์), ตัวอย่างที่ 2 นอกจาก *Ogataea phyllophila* sp. nov. แล้วยังแยกได้ *Candida maltosa* (1 สายพันธุ์) ส่วนตัวอย่างที่ 3 ที่แยกได้ *Ogataea phyllophila* sp. nov. ยังแยกได้ *Debaryomyces nepalensis* (1 สายพันธุ์)

4. *Candida chumphonensis* sp. nov. (1 สายพันธุ์) แยกได้จากตัวอย่างใบพืชที่ไม่รู้ชื่อบนเกาะมาตรา จังหวัดชุมพร และในตัวอย่างเดียวกันนี้ยังแยกได้ *Candida nivariensis* (1 สายพันธุ์) และ *Debaryomyces nepalensis* (1 สายพันธุ์)

5. *Candida mattranensis* sp. nov. (1 สายพันธุ์) แยกได้จากตัวอย่างใบพืชที่ไม่รู้ชื่อบนเกาะมาตรา จังหวัดชุมพร และในตัวอย่างเดียวกันนี้ยังแยกได้ *Candida nivariensis* (1 สายพันธุ์)

6. *Ogataea* sp. LN18 (1 สายพันธุ์) แยกได้จากตัวอย่างใบพืชที่ไม่รู้ชื่อบนเกาะมาตรา จังหวัดชุมพร และในตัวอย่างเดียวกันนี้ยังแยกได้ *Candida nivariensis* (1 สายพันธุ์) และสายพันธุ์ที่เหมือนกับ *Wickerhamia* sp. ST-122 (1 สายพันธุ์)

7. *Ogataea polymorpha* (1 สายพันธุ์) แยกได้จากตัวอย่างใบมันสำปะหลัง บนเกาะมาตรา จังหวัดชุมพร โดยตัวอย่างนี้ไม่พบยีสต์ชนิดอื่น

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบพืช แสดงว่าใบพืชแต่ละตัวอย่างแยกได้ยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์ในจำนวน ชนิด ที่แตกต่างกันไปตั้งแต่ แยกไม่ได้เลยไปจนถึงแยกได้สูงสุดถึง 4 สปีชีส์ (ตารางที่ 15 และภาพที่ 19) โดยมีรายละเอียดต่างๆ ดังนี้คือ

ตัวอย่างใบพืชที่ไม่สามารถแยกยีสต์ทั่วไปได้เลยมี 7 ตัวอย่าง (7.2 เปอร์เซ็นต์), แยกได้ยีสต์ทั่วไป 1 สปีชีส์ มี 58 ตัวอย่าง (59.8 เปอร์เซ็นต์), แยกได้ยีสต์ทั่วไป 2 สปีชีส์ มี 22 ตัวอย่าง (22.7 เปอร์เซ็นต์), แยกได้ยีสต์ทั่วไป 3 สปีชีส์ มี 8 ตัวอย่าง (8.2 เปอร์เซ็นต์) และแยกได้ยีสต์ทั่วไป 4 สปีชีส์ มี 2 ตัวอย่าง (2.1 เปอร์เซ็นต์) ส่วนเมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์พบมีตัวอย่างที่ไม่สามารถแยกได้เมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์เลย มี 88 ตัวอย่าง (90.7 เปอร์เซ็นต์) และแยกได้เมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์ 1 สปีชีส์ มี 9 ตัวอย่าง จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า เมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์พบได้จากตัวอย่างใบพืชน้อยมาก

โดยจำนวนตัวอย่างที่ไม่พบเมทิลโลโทรฟิเคียสต์มีมากถึง 90.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่จำนวนตัวอย่างที่ไม่พบยีสต์ทั่วไปมีเพียง 7.2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ทุกตัวอย่างที่พบเมทิลโลโทรฟิเคียสต์พบเพียงหนึ่งสปีชีส์ต่อตัวอย่างเท่านั้น ซึ่งแตกต่างกับยีสต์ทั่วไปที่พบว่ามีถึง 33 ตัวอย่างที่พบยีสต์มากกว่าหนึ่งสปีชีส์ต่อหนึ่งตัวอย่าง ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า เมทิลโลโทรฟิเคียสต์มีความหลากหลายต่ำกว่ายีสต์ทั่วไปมาก



ภาพที่ 19 แสดงจำนวนของตัวอย่างที่แยกได้ยีสต์อย่างน้อย 1 สปีชีส์และตัวอย่างที่ไม่สามารถแยกได้ยีสต์เลย

จากผลการทดลองแสดงว่า สามารถพบยีสต์บนผิวใบพืชได้ โดย Nix-Stohr *et al.* (2007) อธิบายว่า พื้นผิวของใบพืชเป็นแหล่งที่อยู่ที่เหมาะสมแหล่งหนึ่งสำหรับจุลินทรีย์ เนื่องจากลักษณะทางกายภาพของใบพืชมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา และมีสารอาหารที่เพียงพอ โดยสารอาหารส่วนใหญ่บนผิวใบพืชจะพบในระยะเวลาสั้นๆ พบได้น้อยชนิดและกระจัดกระจายบนผิวใบพืช สารอาหารบนผิวใบพืชจะสร้างมาจากจุลินทรีย์ จากสารที่เซลล์พืชหลั่งออกมา หรือมาจากดินบริเวณที่พืชนั้นเจริญอยู่

นอกจากนั้นเป็นที่น่าสังเกตว่าจากการแยกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ครั้งนี้ จากเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่แยกได้ทั้งหมด 9 สายพันธุ์ มีเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างใบพืชที่เก็บจากเกาะมาตรา จังหวัดชุมพร มากถึง 7 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่า ยีสต์ทั่วไปที่แยกได้จากตัวอย่างใบพืชที่เก็บมาจากพื้นที่นี้มีมากถึง 29 สายพันธุ์ จากยีสต์ทั่วไปทั้งหมดที่แยกได้ในการศึกษาคครั้งนี้ 137 สายพันธุ์ หรือเท่ากับ 21.2 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุที่ทำให้พบยีสต์ได้จากพื้นที่นี้มาก อาจเนื่องมาจากพื้นที่นี้เป็นพื้นที่ปิดมีสภาพเป็นป่ารกที่ไม่ค่อยมีคนอยู่อาศัย ดังนั้น ยีสต์และจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ไม่ได้ได้รับการรบกวนจากสารพิษและสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงความหลากหลายของจุลินทรีย์ จึงทำให้พบยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ในพื้นที่บริเวณนี้ได้จำนวนมาก นอกจากนี้เมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่แยกได้จากพื้นที่ในบริเวณนี้พบว่าเป็นเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่เป็นสปิซีสใหม่ถึง 4 สปิซีส ซึ่งผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับการวิจัยของ Joshi (2008) ที่รายงานว่า การปล่อยแก๊สพิษจากรถยนต์, กิจกรรมต่างๆ ของมนุษย์ที่ทำให้เกิดฝุ่นละอองหรือโลหะหนักตกค้างในบรรยากาศ เช่น การไหม้หิน, ไหม้ทราย และการสร้างถนน ล้วนแต่เป็นสาเหตุที่ส่งผลต่อการเจริญและความหลากหลายของจุลินทรีย์ โดยในการศึกษาของเขาได้เปรียบเทียบจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์บนผิวใบพืชใน 2 พื้นที่ คือ บริเวณที่มีมลภาวะมากกับบริเวณที่ไม่มีมลภาวะ ผลพบว่าจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในพื้นที่ที่ไม่มีมลภาวะมีความหลากหลายของชนิดและจำนวนมากกว่าบริเวณที่มีมลภาวะอย่างเห็นได้ชัดเจน ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่า หากพื้นที่ใดมีผู้คนอยู่อาศัยหรือเดินทางผ่านไปมาเป็นประจำก็อาจทำลายความหลากหลายของจุลินทรีย์ในพื้นที่นั้นๆ ได้โดยไม่ได้เจตนา

สำหรับเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่แยกจากใบพืชนั้น ปัจจุบันยังมีรายงานน้อย โดยสปิซีสที่มีรายงาน เช่น *O. allantospora* และ *O. nitrataversa* พบในประเทศอิตาลี (Peter *et al.*, 2007; 2008) และ *O. cecidiorum* พบในประเทศรัสเซีย (Glushakova *et al.*, 2010) ในขณะที่เมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่พบในการศึกษาคครั้งนี้คือ *O. allantospora* ซึ่งมีรายงานว่าพบบนผิวใบพืชมาก่อน โดย Peter *et al.* (2007), *O. siamensis* ซึ่งเป็นเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่พบครั้งแรกในประเทศไทย โดย Limtong *et al.* (2008) และ *O. polymorpha* และยังพบเมทิลโลโทรฟิเคียสต์สปิซีสใหม่อีกมากถึง 4 สปิซีส

ตารางที่ 15 แสดงชนิดของยีสต์ทั่วไปและเมทิลโลโทรฟิเคยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างใบพืชแต่ละชนิด

แหล่ง	สถานที่	ตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่ แยกได้	จำนวนเมทิลโลโทรฟิเค ยีสต์ที่แยกได้	สปีชีส์
		ชนิดใบพืช			
1	ค่ายลูกเสือวชิราวุธ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี	ประดู่ป่า	1	-	<i>Candida glabrata</i>
		สัก	1	-	<i>Kazachstania siamensis</i>
		ยูคาลิปตัส	1	-	<i>Candida stigmatis</i>
		มะม่วง	-	-	-
		กระถินณรงค์	1	-	<i>Candida etchellsii</i>
		พุทธรักษา	1	-	<i>Candida apicola</i>
		มะม่วงหิมพานต์	-	-	-
		ขนุน	2	-	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i>
		หูกวาง	-	-	-
		นนทรีป่า	1	-	<i>Candida sirachaensis</i> sp. nov.
		หางนกยูงฝรั่ง	1	-	<i>Kazachstania siamensis</i>
		จามจุรี	-	-	-
		ค้อย	1	-	<i>Candida glabrata</i>
		โมก	-	-	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

แหล่ง	สถานที่	ตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่ แยกได้	จำนวนเมทิลโดโทรฟิค ยีสต์ที่แยกได้	สปีชีส์
		ชนิดใบพืช			
2	สำนักงานการท่องเที่ยว โรงเรียน จปร. จ.นครนายก	ชบา	1	1	<i>Candida glabrata</i> , closest to <i>Ogataea allantospora</i>
		มะขาม	1	-	<i>Candida glabrata</i>
		พญาสัตบรรณ	1	-	<i>Candida potacharoeniae</i>
		สน	-	-	-
		ราชพฤกษ์	1	-	<i>Candida nodaensis</i>
		มะพร้าว	3	-	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Sporidiobolus ruineniae</i> , closest to <i>Pichia myanmaensis</i>
		เฟื่องฟ้า	1	-	<i>Aureobasidium pullulans</i>
		ไม่รู้ชื่อ	1	-	<i>Candida tropicalis</i>
		เข็ม	1	-	<i>Aureobasidium pullulans</i>
		มะละกอ	1	-	<i>Aureobasidium pullulans</i>
ไผ่	4	-	<i>Debaryomyces nepalensis</i> , <i>Hyphopichia burtonii</i> , <i>Trichosporon asahii</i> , species similar to <i>Pichia</i> sp. ST- 335		

ตารางที่ 15 (ต่อ)

แหล่ง	สถานที่	ตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่ แยกได้	จำนวนเมทิลโดโทรฟิค ยีสต์ที่แยกได้	สปีชีส์
		ชนิดใบพืช			
3	อ่างเก็บน้ำคลองโบริ จ.นครนายก	พุทรา	1	-	<i>Candida tropicalis</i>
		ตะขบ	2	-	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Candida trypodendroni</i>
		หูกวาง	1	-	<i>Wickerhamomyces edaphicus</i>
		สาบเสือ	2	-	<i>Metschnikowia koreensis</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i>
4	เขื่อนขุนด่านปราการชล จ.นครนายก	กระถินณรงค์	4	-	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Candida amphixiae</i> , <i>Pseudozyma aphidis</i> , <i>Starmerella meliponinorum</i>
		ลีลาวดี	2	-	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Starmerella meliponinorum</i>
		มะขาม	1	-	<i>Kodamaea ohmeri</i>
		ราชพฤกษ์	2	-	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Candida jaroonii</i>
5	อ่างเก็บน้ำจักรพงษ์ จ.ปราจีนบุรี	หางนกยูงฝรั่ง	1	-	<i>Pichia kudriavzevii</i>
		เฟื่องฟ้า	2	-	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Torulasporea delbrueckii</i>
		มะม่วง	1	-	<i>Hanseniaspora opuntiae</i>

ตารางที่ 15 (ต่อ)

แหล่ง	สถานที่	ตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่	จำนวนเมทิลโดโทรฟิก	สปีชีส์
		ชนิดใบพืช	แยกได้	ยีสต์ที่แยกได้	
6	เขาค้อ จ.ปราจีนบุรี	กระถินณรงค์	3	-	<i>Pichia galeiformis</i> , <i>Torulaspota pretoriensis</i> , closest to <i>Pichia myanmaensis</i>
		กระถิน	1	-	<i>Hyphopichia burtonii</i>
		สาบเสือ	2	-	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
7	อุทยานกบินทร์เฉลิมราชย์ จ.ปราจีนบุรี	โพธิ์	2	-	<i>Candida rugosa</i> , <i>Candida tropicalis</i>
		พญาสัตบรรณ	1	-	<i>Candida tropicalis</i>
		มะขาม	3	-	<i>Candida rugosa</i> , <i>Kodamaea ohmeri</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i>
		ประดู่	2	-	<i>Candida tropicalis</i> , <i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
		ลีลาวดี	2	-	<i>Candida tropicalis</i> , <i>Trichosporon asahii</i>
8	โครงการชุดลอก หนองสระหิน จ.สระแก้ว	มะขามเทศ	2	-	<i>Candida rugosa</i> , <i>Candida tropicalis</i>
9	อ่างเก็บน้ำบ้านห้วยชัน จ.สระแก้ว	รัก	1	-	<i>Kodamaea ohmeri</i>

ตารางที่ 15 (ต่อ)

แหล่ง	สถานที่	ตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่ แยกได้	จำนวนเมทิลโดโทรฟิค ยีสต์ที่แยกได้	สปีชีส์
		ชนิดใบพืช			
10	อ่างเก็บน้ำพระปรอง จ.สระแก้ว	พุทรา	2	-	<i>Candida tropicalis</i> , <i>Pichia kudriavzevii</i>
		อ้อย	2	-	<i>Hanseniaspora opuntiae</i> , closest to <i>Meyerozyma guilliermondii</i>
		พญาสัตบรรณ	1	-	<i>Candida rugosa</i>
		ราชพฤกษ์	1	-	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
		ลิลาวดี	3	-	<i>Candida maltosa</i> , <i>Candida sakaeoensis</i> sp.nov., <i>Trichosporon mucoides</i>
		บัว	1	-	<i>Candida glabrata</i>
		สัก	1	-	<i>Candida tropicalis</i>
		บอน	1	-	<i>Candida rugosa</i>
11	อ่างเก็บน้ำห้วยยาง จ.สระแก้ว	รัก	2	-	<i>Candida rugosa</i> , <i>Pichia galeiformis</i>
		ไม่รู้ชื่อ	1	-	<i>Pichia rhodanensis</i>
		มะพร้าว	2	-	<i>Candida metapsilosis</i> , <i>Hyphopichia burtonii</i>
		ประดู่	1	-	<i>Candida sakaeoensis</i> sp.nov.

ตารางที่ 15 (ต่อ)

แหล่ง	ตัวอย่าง		จำนวนยีสต์ที่แยกได้	จำนวนเมทิลโดโทรฟิกยีสต์ที่แยกได้	สปีชีส์
	สถานที่	ชนิดใบพืช			
12	แหล่งน้ำเพื่อการดับเพลิง จ.บุรีรัมย์	โพธิ์	2	-	<i>Candida tropicalis</i> , <i>Hanseniaspora opuntiae</i>
		ไทรย้อย	1	-	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
		เข็ม	1	-	<i>Candida glabrata</i>
		มะขม	1	-	<i>Clavispora lusitaniae</i>
13	วัดห้วยมงคล อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	สับปะรด	1	-	<i>Candida sorboxylosa</i>
		อ้อยแห้ง	3	-	<i>Trichosporon asahii</i> , <i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> , closest to <i>Meyerozyma guilliermondii</i>
14	บ้านทุ่งเสื่อนอน อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	อ้อย	1	-	closest to <i>Meyerozyma guilliermondii</i>
		อ้อยแห้ง	1	-	closest to <i>Meyerozyma guilliermondii</i>
15	อ.ชุมพล จ.ชุมพร	พุทรา	1	-	<i>Pichia kudriavzevii</i>
16	ปากน้ำชุมพร จ.ชุมพร	ปาล์ม	2	1	<i>Debaryomyces nepalensis</i> , <i>Kodamaea ohmeri</i> , closest to <i>Ogataea siamensis</i>
		ปาล์มแห้ง	3	-	closest to <i>Candida sojae</i> , species similar to <i>Geotrichum</i> sp. SKK15, closest to <i>Meyerozyma guilliermondii</i>
17	อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร	ยางพารา	1	-	<i>Debaryomyces nepalensis</i>

ตารางที่ 15 (ต่อ)

แหล่ง	สถานที่	ตัวอย่าง ชนิดใบพืช	จำนวนยีสต์ที่	จำนวนเมทิลโดโทรฟิก	สปีชีส์
			แยกได้	ยีสต์ที่แยกได้	
18	เกาะมาตรา จ.ชุมพร	กล้วย	1	-	<i>Candida tropicalis</i>
		ไม่รู้ชื่อ 1	1	-	<i>Hanseniaspora thailandica</i>
		ไม่รู้ชื่อ 2	3	1	<i>Candida parapsilosis</i> , <i>Debaryomyces nepalensis</i> , <i>Hanseniaspora thailandica</i> , <i>Ogataea phyllophila</i> sp. nov.
		ไม่รู้ชื่อ 3	1	1	<i>Candida maltosa</i> , <i>Ogataea phyllophila</i> sp. nov.
		ไม่รู้ชื่อ 4	2	1	<i>Candida nivariensis</i> , <i>Debaryomyces nepalensis</i> , <i>Candida chumphonensis</i> sp. nov.
		ไม่รู้ชื่อ 5	1	-	<i>Candida maltosa</i>
		ไม่รู้ชื่อ 6	1	1	<i>Debaryomyces nepalensis</i> , <i>Ogataea phyllophila</i> sp. nov.
		ไม่รู้ชื่อ 7	2	-	<i>Candida tropicalis</i> , closest to <i>Pichia bimundalis</i>
		ไม่รู้ชื่อ 8	1	-	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
		ไม่รู้ชื่อ 9	1	-	<i>Candida nivariensis</i>
		ไม่รู้ชื่อ 10	1	-	<i>Candida maltosa</i>

ตารางที่ 15 (ต่อ)

แหล่ง	สถานที่	ตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่	จำนวนเมทิลโดโทรฟิก	สปีชีส์
		ชนิดใบพืช	แยกได้	ยีสต์ที่แยกได้	
		ไม่รู้ชื่อ 11	1	-	<i>Kodamaea ohmeri</i>
		ไม่รู้ชื่อ 12	1	-	<i>Hanseniaspora thailandica</i>
		ไม่รู้ชื่อ 13	2	-	<i>Candida maltosa</i> , closest to <i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>
		ไม่รู้ชื่อ 14	1	1	<i>Candida nivariensis</i> , <i>Candida mattranensis</i> sp. nov.
		ไม่รู้ชื่อ 15	2	1	<i>Candida nivariensis</i> , species similar to <i>Wickerhamia</i> sp. ST-122, <i>Ogataea</i> sp. LN18
		เฟิร์น	3	-	<i>Candida tropicalis</i> , <i>Hyphopichia burtonii</i> , <i>Meyerozyma guilliermondii</i>
		อ้อย	1	-	<i>Candida glabrata</i>
		มะเดื่อ	1	-	<i>Candida amphixiae</i>
		มะพร้าว	1	-	<i>Candida nivariensis</i>
		มันสำปะหลัง	-	1	<i>Ogataea polymorpha</i>
		ไม่รู้ชื่อ	1	-	<i>Debaryomyces nepalensis</i>

ตารางที่ 15 (ต่อ)

แหล่ง	สถานที่	ตัวอย่าง ชนิดใบพืช	จำนวนยีสต์ที่		สปีชีส์
			แยกได้	จำนวนเมทิลโดโทรฟิก ยีสต์ที่แยกได้	
19	ทางหลวงชนบท กม.7 อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร	ส้มโอ	1	-	species similar to <i>Candida</i> sp. 05-7-186T
		ไม่รู้ชื่อ	1	-	species similar to <i>Candida</i> sp. 05-7-186T
		มังคุด	1	-	<i>Candida tropicalis</i>
		กล้วย	2	-	<i>Pichia kudriavzevii</i> , <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>
20	วัดทางสาย อ.บางสะพาน จ.ประจวบคีรีขันธ์	ลิลาวดี	1	-	<i>Kodamaea ohmeri</i>

6. การสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกของยีสต์ทั้งหมดที่แยกได้เมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากยีสต์ส่วนใหญ่ในประเทศไทยเป็นการใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม เช่น การนำมาใช้เพื่อผลิตขนมปัง, ผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์, สารให้ความหวาน และสารสี แต่สำหรับการใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ โดยเฉพาะทางด้านการเกษตรมีน้อย และในขณะนี้ทั่วโลกได้ให้ความสนใจในการใช้ประโยชน์จากปุ๋ยทางชีวภาพมากขึ้น เพื่อลดผลกระทบที่เกิดจากการใช้ปุ๋ยเคมีให้มากที่สุด ดังนั้นการศึกษาความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตและปลดปล่อยสารเมแทบอลิต์หลายชนิดที่มีผลต่อการเจริญและความสมบูรณ์ของพืชจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง (Young *et al.*, 2006) โดยสำหรับยีสต์นั้นจะผลิตสารประเภทออกซิน (auxin) บางชนิดออกมา โดยชนิดที่พบเป็นหลักคือ กรดอินโดล-3-อะซีติก (Indole-3-acetic acid, IAA) ซึ่งทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญของพืช โดยเพิ่มการยืดยาวของเซลล์ เพิ่มการแบ่งเซลล์ และเพิ่มการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืช (Nassar *et al.*, 2005)

จากการตรวจสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกของยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่แยกได้ 146 สายพันธุ์ จากผิวใบพืชในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว YPD ที่เติมแอล-ทริปโตเฟน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง บ่มบนเครื่องเขย่านาน 7 วัน ตามวิธีของ Xin *et al.* (2009) ตรวจกรดอินโดล-3-อะซีติกโดยอาศัยหลักการตรวจความเข้มของสีที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากเติม Salkowski reagent

จากยีสต์ทั่วไป, เมทิลโลโทรฟิเคียส และราคล้ายยีสต์ 146 สายพันธุ์ พบว่ามียีสต์ทั่วไปจำนวน 43 สายพันธุ์ และราคล้ายยีสต์อีก 8 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ (34.9 เปอร์เซ็นต์) โดยสร้างได้ในปริมาณแตกต่างกันไป (ตารางที่ 16) มียีสต์ทั่วไป 86 สายพันธุ์ และเมทิลโลโทรฟิเคียสทุกสายพันธุ์ (9 สายพันธุ์) ที่ไม่สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้จากสายพันธุ์ที่สร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ มี 9 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ คือ *C. amphixiae* LM122 ซึ่งสร้างได้ 85.7 มิลลิกรัมต่อลิตร, *C. maltosa* LM069, LM100, LM103, LM110 และ LM114 ซึ่งสร้างได้ 121.4, 130.5, 237.1, 159.5 และ 314.3 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ, *C. rugosa* LM060 และ LM066 ซึ่งสร้างได้ 98.6 และ 101.9 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ และ *Sp. ruineniae* LM015 ซึ่งสร้างได้ 84.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่สายพันธุ์ที่เหลือสร้างได้ 24.3-81.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้น จึงได้ทดลองนำยีสต์ 9 สายพันธุ์ ที่สร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ปริมาณค่อนข้างสูงเหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกเมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาस्कต่อไป

ตารางที่ 16 แสดงการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิติลและการเจริญโดยยีสต์ที่แยกได้จากใบพืช เมื่อเลี้ยงในอาหาร YPD ที่เติมแอล-ทริปโตเฟน 1 เปอร์เซ็นต์ ในหลอดทดสอบและบ่มแบบเขย่านาน 7 วัน

Species	Cell Dry Weight (g/l)	IAA (mg/l)
Ascomycetous yeasts		
<i>Candida amphixiae</i> LM034	nd	0
<i>Candida amphixiae</i> LM122	8.1	85.7
<i>Candida apicola</i> LM005	nd	0
<i>Candida etchellsii</i> LM004	nd	0
<i>Candida glabrata</i> LM001	9.6	50.5
<i>Candida glabrata</i> LM010	nd	0
<i>Candida glabrata</i> LM011	nd	0
<i>Candida glabrata</i> LM012	nd	0
<i>Candida glabrata</i> LM070	nd	0
<i>Candida glabrata</i> LM082	nd	0
<i>Candida glabrata</i> LM121	10.3	25.7
<i>Candida jaroonii</i> LM039	nd	0
<i>Candida maltosa</i> LM069	10.0	121.4
<i>Candida maltosa</i> LM100	10.4	130.5
<i>Candida maltosa</i> LM103	10.6	237.1
<i>Candida maltosa</i> LM110	11.2	159.5
<i>Candida maltosa</i> LM114	11.6	314.3
<i>Candida metapsilosis</i> LM077	11.4	81.0
<i>Candida nivariensis</i> LM102	nd	0
<i>Candida nivariensis</i> LM109	7.6	39.0
<i>Candida nivariensis</i> LM115	9.0	27.1
<i>Candida nivariensis</i> LM116	8.7	37.6
<i>Candida nivariensis</i> LM123	8.5	51.4
<i>Candida nodaensis</i> LM014	nd	0
<i>Candida parapsilosis</i> LM099	11.2	71.4
<i>Candida potacharoeniae</i> LM013	nd	0
<i>Candida rugosa</i> LM050	nd	0
<i>Candida rugosa</i> LM053	nd	0
<i>Candida rugosa</i> LM060	11.1	98.6

ตารางที่ 16 (ต่อ)

Species	Cell Dry Weight (g/l)	IAA (mg/l)
<i>Candida rugosa</i> LM066	11.3	101.9
<i>Candida rugosa</i> LM072	nd	0
<i>Candida rugosa</i> LM074	13.3	66.9
<i>Candida sakaeoensis</i> sp. nov. LM068	9.3	31.9
<i>Candida sakaeoensis</i> sp. nov. LM078	nd	0
<i>Candida sirachaensis</i> sp. nov. LM008	nd	0
<i>Candida sorboxylosa</i> LM084	nd	0
<i>Candida stigmatis</i> LM003	nd	0
<i>Candida tropicalis</i> LM019	nd	0
<i>Candida tropicalis</i> LM024	nd	0
<i>Candida tropicalis</i> LM049	11.2	32.9
<i>Candida tropicalis</i> LM051	11.8	54.3
<i>Candida tropicalis</i> LM055	nd	0
<i>Candida tropicalis</i> LM057	11.6	33.8
<i>Candida tropicalis</i> LM059	nd	0
<i>Candida tropicalis</i> LM062	11.7	31.9
<i>Candida tropicalis</i> LM071	9.9	31.4
<i>Candida tropicalis</i> LM079	nd	0
<i>Candida tropicalis</i> LM096	nd	0
<i>Candida tropicalis</i> LM105	10.1	43.8
<i>Candida tropicalis</i> LM118	11.7	53.3
<i>Candida tropicalis</i> LM127	12.4	37.6
<i>Candida trypodendroni</i> LM026	nd	0
<i>Clavispora lusitaniae</i> LM083	nd	0
<i>Debaryomyces nepalensis</i> LM091	nd	0
<i>Debaryomyces nepalensis</i> LM095	nd	0
<i>Debaryomyces nepalensis</i> LM101	nd	0
<i>Debaryomyces nepalensis</i> LM104	nd	0
<i>Debaryomyces nepalensis</i> LM107	8.8	32.4
<i>Debaryomyces nepalensis</i> LM108	9.5	36.2
<i>Debaryomyces nepalensis</i> LM124	nd	0
<i>Debaryomyces nepalensis</i> LN04	nd	0

ตารางที่ 16 (ต่อ)

Species	Cell Dry Weight (g/l)	IAA (mg/l)
<i>Debaryomyces nepalensis</i> LN13	nd	0
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> LM067	nd	0
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> LM129	nd	0
<i>Hanseniaspora opuntiae</i> LM007	nd	0
<i>Hanseniaspora opuntiae</i> LM043	3.9	44.8
<i>Hanseniaspora opuntiae</i> LM064	nd	0
<i>Hanseniaspora opuntiae</i> LM080	nd	0
<i>Hanseniaspora thailandica</i> LM097	nd	0
<i>Hanseniaspora thailandica</i> LM098	nd	0
<i>Hanseniaspora thailandica</i> LM112	nd	0
<i>Kazachstania siamensis</i> LM002	6.4	43.3
<i>Kazachstania siamensis</i> LM009	nd	0
<i>Kluyveromyces marxianus</i> LM081	nd	0
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> LM047	7.5	35.7
<i>Kodamaea ohmeri</i> LM037	nd	0
<i>Kodamaea ohmeri</i> LM052	9.9	25.7
<i>Kodamaea ohmeri</i> LM061	nd	0
<i>Kodamaea ohmeri</i> LM090	nd	0
<i>Kodamaea ohmeri</i> LM111	9.6	24.3
<i>Kodamaea ohmeri</i> LM130	nd	0
<i>Metschnikowia koreensis</i> LM029	nd	0
<i>Hyphopichia burtonii</i> LM022	nd	0
<i>Hyphopichia burtonii</i> LM046	11.0	38.6
<i>Hyphopichia burtonii</i> LM076	nd	0
<i>Hyphopichia burtonii</i> LM119	nd	0
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> LM120	8.3	68.1
<i>Pichia galeiformis</i> LM044	nd	0
<i>Pichia galeiformis</i> LM073	nd	0
<i>Pichia kudriavzevii</i> LM006	nd	0
<i>Pichia kudriavzevii</i> LM030	nd	0
<i>Pichia kudriavzevii</i> LM040	nd	0
<i>Pichia kudriavzevii</i> LM054	nd	0

ตารางที่ 16 (ต่อ)

Species	Cell Dry Weight (g/l)	IAA (mg/l)
<i>Pichia kudriavzevii</i> LM063	nd	0
<i>Pichia kudriavzevii</i> LM089	nd	0
<i>Pichia kudriavzevii</i> LM128	10.4	27.1
<i>Pichia rhodanensis</i> LM075	nd	0
<i>Starmerella meliponinorum</i> LM032	nd	0
<i>Starmerella meliponinorum</i> LM035	nd	0
<i>Torulasporea delbrueckii</i> LM041	7.4	27.1
<i>Torulasporea pretoriensis</i> LM045	7.5	36.2
<i>Wickerhamomyces edaphicus</i> LM028	nd	0
Similar to <i>Candida</i> sp. 05-7-186T (LM125)	nd	0
Similar to <i>Candida</i> sp. 05-7-186T (LM126)	nd	0
Similar to <i>Geotrichum</i> sp. SKK15 (LM092)	nd	0
Similar to <i>Pichia</i> sp. ST-335 (LM023)	nd	0
Similar to <i>Wickerhamia</i> sp. ST-122 (LM117)	9.2	41.9
Closest to <i>Candida sojae</i> (LM093)	11.1	62.9
Closest to <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (LM065)	9.4	31.9
Closest to <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (LM086)	nd	0
Closest to <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (LM087)	nd	0
Closest to <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (LM088)	nd	0
Closest to <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (LM094)	nd	0
Closest to <i>Pichia bimundalis</i> (LM106)	nd	0
Closest to <i>Pichia myanmaensis</i> (LM016)	nd	0
Closest to <i>Pichia myanmaensis</i> (LN06)	nd	0
Basidiomycetous yeasts	nd	0
<i>Pseudozyma aphidis</i> LN05	6.0	27.1
<i>Sporidiobolus ruineniae</i> LM015	5.6	84.3
<i>Trichosporon asahii</i> LM085	nd	0
<i>Trichosporon asahii</i> LN03	nd	0
<i>Trichosporon asahii</i> LN08	nd	0
<i>Trichosporon mucooides</i> LN09	nd	0
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> LN07	nd	0
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> LN10	nd	0

ตารางที่ 16 (ต่อ)

Species	Cell Dry Weight (g/l)	IAA (mg/l)
Closest to <i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> (LM113)	nd	0
Methylotrophic yeasts		
<i>Candida chumphonensis</i> sp. nov. LN15	nd	0
<i>Candida matranensis</i> sp. nov. LN17	nd	0
<i>Ogataea thermophila</i> LN19	nd	0
<i>Ogataea phyllophila</i> sp. nov. LN12	nd	0
<i>Ogataea phyllophila</i> sp. nov. LN14	nd	0
<i>Ogataea phyllophila</i> sp. nov. LN16	nd	0
<i>Ogataea</i> sp. LN18	nd	0
Closest to <i>Ogataea allantospora</i> (LN01)	nd	0
Closest to <i>Ogataea siamensis</i> (LN11)	nd	0
Yeast-like fungi		
<i>Aureobasidium pullulans</i> LM017	9.9	52.9
<i>Aureobasidium pullulans</i> LM018	9.7	57.1
<i>Aureobasidium pullulans</i> LM020	7.8	33.3
<i>Aureobasidium pullulans</i> LM021	nd	0
<i>Aureobasidium pullulans</i> LM025	7.4	34.8
<i>Aureobasidium pullulans</i> LM027	9.8	29.5
<i>Aureobasidium pullulans</i> LM031	nd	0
<i>Aureobasidium pullulans</i> LM033	nd	0
<i>Aureobasidium pullulans</i> LM036	nd	0
<i>Aureobasidium pullulans</i> LM038	8.0	58.6
<i>Aureobasidium pullulans</i> LM042	8.4	43.8
<i>Aureobasidium pullulans</i> LM048	7.7	35.7

หมายเหตุ: nd คือ มีการเจริญแต่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

7. การสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกของยีสต์ที่สร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกได้ปริมาณมากเมื่อเพาะเลี้ยงในพลาสติก

ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิก เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ที่เติมแอล-ทริปโตเฟน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน พบว่า *Sp. ruineniae* LM015 ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอบีคิติกชนิดเดียว ที่เลือกมาศึกษาการสร้างในพลาสติก สามารถผลิตกรดอินโดล-3-อะซิดิกได้ความเข้มข้นสูงสุด คือ 436.4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ *C. amphixiae* LM122 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดอินโดล-3-อะซิดิกได้ความเข้มข้นต่ำที่สุด คือ 82.6 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 17) เมื่อพิจารณาการเจริญพบว่า *Sp. ruineniae* LM015 เจริญได้เซลล์ 9.0 กรัมต่อลิตร ส่วน *C. amphixiae* LM122 เจริญได้เซลล์ 8.6 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 17)

แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณของกรดอินโดล-3-อะซิดิกที่สร้างได้จากการเพาะเลี้ยงในพลาสติก (ตารางที่ 17) และในหลอดทดลอง (ตารางที่ 16) พบว่า มีเพียง *Sp. ruineniae* LM015 เท่านั้นที่ผลิตกรดอินโดล-3-อะซิดิกได้สูงขึ้นมา เมื่อเพาะเลี้ยงในพลาสติก โดยสร้างได้สูงกว่าถึง 352.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มี 3 สายพันธุ์ ที่สร้างได้สูงขึ้นมาข้างมากเช่นกัน คือ *C. maltosa* LM100, LM110 และ LM114 โดยสร้างได้สูงถึง 61.9, 62.9 และ 60.9 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน 4 สายพันธุ์สร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกได้ในระดับที่ใกล้เคียงกับเมื่อเลี้ยงในหลอดทดลอง คือ *C. amphixiae* LM122, *C. maltosa* LM069, *C. rugosa* LM060 และ LM066 ในขณะที่ *C. maltosa* LM103 ให้ผลตรงกันข้ามคือ สามารถสร้างได้ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในหลอดทดลอง คือ โดยสร้างได้ลดลงเหลือ 60.4 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 17) จากการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกในปริมาณที่แตกต่างกัน เมื่อใช้การเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากความต้องการออกซิเจนในปริมาณที่แตกต่างกันของยีสต์แต่ละสายพันธุ์เพื่อการสังเคราะห์กรดอินโดล-3-อะซิดิก เพราะการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองยีสต์ได้รับออกซิเจนปริมาณน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในพลาสติก เนื่องจากพื้นที่ผิวในระหว่างการบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนของหลอดทดลองมีน้อยกว่าในพลาสติก ดังนั้น จากผลดังกล่าว อาจแสดงให้เห็นได้ว่ายีสต์ *Sp. ruineniae* LM015 เป็นสายพันธุ์ที่ต้องการออกซิเจนปริมาณมากเพื่อการเจริญและการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิก

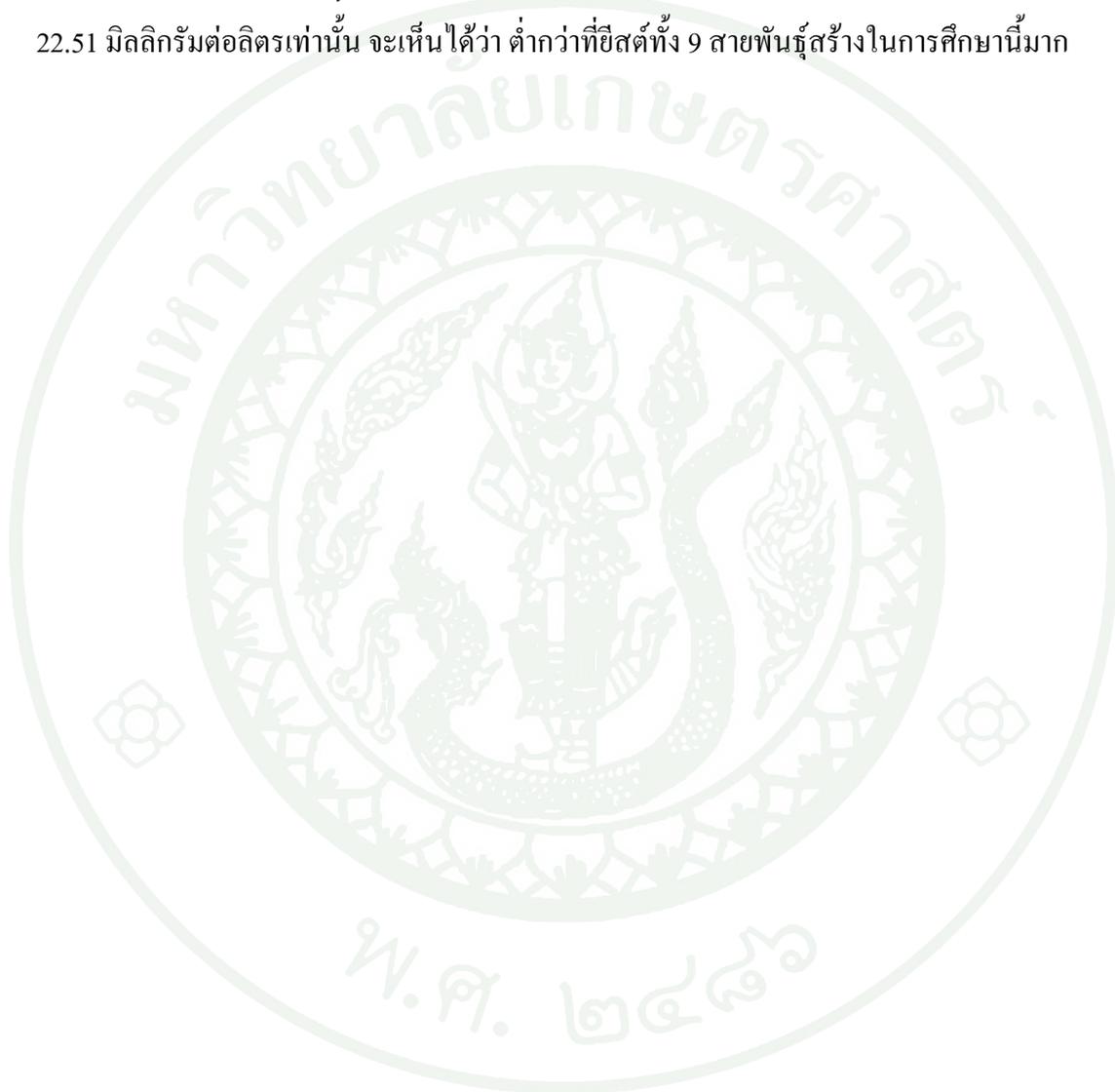
ตารางที่ 17 แสดงการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกและการเจริญ โดยยีสต์ที่แยกได้จากใบพืช เมื่อเลี้ยงในอาหาร YPD ที่เติมแอล-ทริปโตเฟน 1 เปอร์เซ็นต์ ในพลาสติกและบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน

Species	Cell Dry Weight (g/l)	IAA (mg/l)
<i>Candida amphixiae</i> LM122	8.6	82.6
<i>Candida maltosa</i> LM069	11.7	90.2
<i>Candida maltosa</i> LM100	12.3	192.4
<i>Candida maltosa</i> LM103	12.4	176.7
<i>Candida maltosa</i> LM110	12.6	222.4
<i>Candida maltosa</i> LM114	13.7	375.2
<i>Candida rugosa</i> LM060	14.9	123.8
<i>Candida rugosa</i> LM066	14.5	150.2
<i>Sporidiobolus ruineniae</i> LM015	9.0	436.4

สังเกตเห็นว่า ยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ดีที่สุด คือ *Sp. ruineniae* LM015 ซึ่งเป็นแบล็คโอสมัยซีตัสยีสต์ และมีสีแดง (red yeasts) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Xin *et al.* (2009) ที่พบว่า แบล็คโอสมัยซีตัสยีสต์ในสกุล *Rhodotorula* และ *Rhodospiridium* มีความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ โดยสามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ประมาณ 8-40 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ *Sp. ruineniae* LM015 ในการทดลองนี้สร้างได้ 436.4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 48 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งยีสต์ทั้งสองสกุลเป็นแบล็คโอสมัยซีตัสยีสต์ และเป็นยีสต์ที่มีสีแดงเช่นกัน ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่า แบล็คโอสมัยซีตัสยีสต์มีความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ดีกว่าแอสโคไมซีตัสยีสต์ อย่างไรก็ตาม การสร้าง อาจพบได้ในบางสกุลเท่านั้น โดยในการทดลองครั้งนี้แบล็คโอสมัยซีตัสยีสต์บางสกุลไม่สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ เช่น สกุล *Trichosporon*

นอกจากนั้นสิ่งที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่ง คือ ความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกของยีสต์ทั้ง 9 สายพันธุ์ พบว่ามีความสามารถในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีรายงานไม่ว่าจะเป็น แบคทีเรีย รา เส้นใย และแอสโคไมซีตัส เช่น ในการศึกษาของ Ruanpanum *et al.* (2010) แสดงว่า *Fusarium* sp. สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ 1.6-6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร, *Paecilomyces* sp. สร้างได้ 21.7 มิลลิกรัมต่อลิตร, *Aspergillus* sp. สร้างได้ 26.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ *Streptococcus* sp. สร้างได้ 15.9-28.5 มิลลิกรัมต่อลิตร การศึกษาของ

Mujahid *et al.* (2011) รายงานการสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิก โดยแบคทีเรีย คือ *Rubrivivax gelatinosus* สร้างได้ 13 มิลลิกรัมต่อลิตร, *Rubrivivax benzoatilyticus* สร้างได้ 21.6 มิลลิกรัมต่อลิตร, *Rhodobacter sphaeroides* สร้างได้ 9.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, *Rhodobacter megalophilus* สร้างได้ 6.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ *Rhodobacter azotoformans* สร้างได้ 4.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน Nassar *et al.* (2005) รายงานว่ายีสต์ *Cyberlindnera saturnus* สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซิดิกได้เพียง 22.51 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น จะเห็นได้ว่า ค่ากว่าที่ยีสต์ทั้ง 9 สายพันธุ์สร้างในการศึกษานี้มาก



สรุปผล

1. ทำการศึกษาความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบพืชในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทยรวม 20 แห่ง ใน 7 จังหวัด ประกอบด้วย จังหวัดชลบุรี (1 แห่ง), จังหวัดบุรีรัมย์ (1 แห่ง), จังหวัดนครนายก (3 แห่ง), จังหวัดปราจีนบุรี (3 แห่ง), จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (3 แห่ง), จังหวัดสระแก้ว (4 แห่ง) และจังหวัดชุมพร (5 แห่ง) โดยเก็บตัวอย่างใบพืชรวม 97 ตัวอย่าง นำมาแยกยีสต์ทั่วไป และเมทิลโลโทรฟิเคียสต์โดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวน และเก็บยีสต์โดยอาศัยความแตกต่างของโคโลนี ได้ยีสต์ทั่วไป 125 สายพันธุ์ และเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ 9 สายพันธุ์ นอกจากนั้นมีราคล้ายยีสต์ 12 สายพันธุ์ รวม 146 สายพันธุ์ นำมาจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ผลดังนี้

จากการจัดจำแนกยีสต์ทั่วไป 125 สายพันธุ์และราคล้ายยีสต์อีก 12 สายพันธุ์ สรุปผลได้ดังนี้

1) ยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว 119 สายพันธุ์

1.1) แอสโคไมซีตส์ยีสต์ 99 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น 14 สกุล 35 สปีชีส์

(1) สกุล *Candida* คือ *Candida amphixiae*, *C. apicola*, *C. etchellsii*, *C. glabrata*, *C. jaroonii*, *C. maltosa*, *C. metapsilosis*, *C. nivariensis*, *C. nodaensis*, *C. parapsilosis*, *C. potacharoeniae*, *C. rugosa*, *C. sorboxylosa*, *C. stigmatis*, *C. tropicalis* และ *C. trypodendroni*

(2) สกุล *Clavispora* คือ *Clavispora lusitaniae*

(3) สกุล *Debaryomyces* คือ *Debaryomyces nepalensis*

(4) สกุล *Hanseniaspora* คือ *Hanseniaspora opuntiae*, *H. guilliermondii* และ *H. thailandica*

(5) สกุล *Hyphopichia* คือ *Hyphopichia burtonii*

(6) สกุล *Kazachstania* คือ *Kazachstania siamensis*

(7) สกุล *Kluyveromyces* คือ *Kluyveromyces marxianus* และ *K. thermotolerans*

(8) สกุล *Kodamaea* คือ *Kodamaea ohmeri*

(9) สกุล *Metschnikowia* คือ *Metschnikowia koreensis*

(10) สกุล *Meyerozyma* คือ *Meyerozyma guilliermondii*

(11) สกุล *Pichia* คือ *Pichia galeiformis*, *P. kudriavzevii* และ *P. rhodanensis*

(12) สกุล *Starmerella* คือ *Starmerella meliponinorum*

(13) สกุล *Torulaspota* คือ *Torulaspota delbrueckii* และ

T. pretoriensis

(14) สกุล *Wickerhamomyces* คือ *Wickerhamomyces edaphicus*

1.2) แบคทีเรียโอมัยซีตัสยีสต์ 8 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น 3 สกุล 5 สปีชีส์

(1) สกุล *Pseudozyma* คือ *Pseudozyma aphidis*

(2) สกุล *Trichosporon* คือ *Trichosporon asahii*, *T. mucoides* และ *T.*

mycotoxinivorans

(3) สกุล *Sporidiobolus* คือ *Sporidiobolus ruineniae*

1.3) รากล้ำยีสต์ 12 สายพันธุ์ จัดจำแนกเป็น *Aureobasidium pullulans*

2) ยีสต์ที่เหมือนกับสปีชีส์ที่ยังไม่มีการอธิบาย 5 สายพันธุ์ คือ เหมือนกับ *Candida* sp. 05-7-186T (2 สายพันธุ์), *Geotrichum* sp. SKK15 (1 สายพันธุ์), *Pichia* sp. ST-335 (1 สายพันธุ์) และ *Wickerhamia* sp. ST-122 (1 สายพันธุ์)

3) ยีสต์ที่อาจเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ 10 สายพันธุ์ คือ ใกล้เคียงกับ *Candida sojae* (1 สายพันธุ์), *Meyerozyma guilliermondii* (5 สายพันธุ์), *Pichia bimundalis* (1 สายพันธุ์), *Pichia myanmaensis* (2 สายพันธุ์) และ *Trichosporon mycotoxinivorans* (1 สายพันธุ์)

4) ยีสต์สปีชีส์ใหม่ 3 สายพันธุ์ ซึ่งได้ศึกษาและเสนอเป็น *Candida sakaeoensis* sp. nov. (2 สายพันธุ์) และ *Candida sirachaensis* sp. nov. (1 สายพันธุ์)

การจัดจำแนกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ 9 สายพันธุ์ สรุปผลได้ดังนี้

1) ยีสต์สปีชีส์ที่อธิบายแล้ว 1 สายพันธุ์ คือ *Ogataea polymorpha*

2) ยีสต์ที่อาจเป็นสปีชีส์ที่อธิบายแล้วหรือสปีชีส์ใหม่ 2 สายพันธุ์ คือ *Ogataea allantospora* และ *Ogataea siamensis*

3) ยีสต์สปีชีส์ใหม่ 6 สายพันธุ์ซึ่งได้ศึกษาและเสนอเป็น *Candida chumphonensis* sp. nov. (1 สายพันธุ์), *Candida mattranensis* sp. nov. (1 สายพันธุ์), *Ogataea phyllophila* sp. nov. (3 สายพันธุ์) และ *Ogataea* sp. LN18^T (1 สายพันธุ์)

2. จากการวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์บนผิวใบพืชในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 20 แห่ง ใน 7 จังหวัด แสดงว่ายีสต์สกุลที่พบมากที่สุด คือ สกุล *Candida* มีจำนวน 56 สายพันธุ์ คิดเป็น 38.4 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่ศึกษา โดยจัดอยู่ใน 21 สปีชีส์ได้แก่ *Candida amphixiae*, *C. apicola*, *C. etchellsii*, *C. glabrata*, *C. jaroonii*, *C. maltosa*, *C. metapsilosis*, *C. nivariensis*, *C.*

nodaensis, *C. parapsilosis*, *C. potacharoeniae*, *C. rugosa*, *C. sorboxylosa*, *C. stigmatis*, *C. tropicalis*, *C. trypodendroni*, สปีชีส์ที่เหมือนกับ *Candida* sp. 05-7-186T, *C. chumphonensis* sp. nov., *C. mattranensis* sp. nov., *C. sakaeoensis* sp. nov. และ *C. sirachaensis* sp. nov. สกุลที่พบมากรองลงมาคือ สกุล *Pichia* โดยพบ 4 สปีชีส์ คือ *Pichia galeiformis*, *P. kudriavzevii*, *P. rhodanensis* และสปีชีส์ที่เหมือนกับ *Pichia* sp. ST-335 ส่วนสปีชีส์ที่พบบ้อยที่สุดคือ *C. tropicalis* (14 สายพันธุ์) และสปีชีส์ที่พบมากรองลงมาคือ *A. pullulans* (12 สายพันธุ์) ซึ่งเป็นราคล้ายยีสต์

3. สำหรับการทดสอบความสามารถของยีสต์ที่แยกได้ในการสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่ง พบว่า จากยีสต์ทั่วไป, เมทิลโลโทรฟิเคียส และราคล้ายยีสต์ 146 สายพันธุ์ มียีสต์ทั่วไปที่สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ 43 สายพันธุ์ และราคล้ายยีสต์อีก 8 สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้น 51 สายพันธุ์ (34.9 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่เมทิลโลโทรฟิเคียสทุกสายพันธุ์ของทุกสปีชีส์ไม่สามารถสร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้ โดยมี 9 สายพันธุ์ ใน 4 สปีชีส์ ที่สร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้สูง ในช่วง 84.3-314.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ได้แก่ *C. amphixiae* (1 สายพันธุ์), *C. maltosa* (5 สายพันธุ์), *C. rugosa* (2 สายพันธุ์) และ *Sp. ruineniae* (1 สายพันธุ์) และเมื่อเพาะเลี้ยงในพลาสติกพบว่า *Sp. ruineniae* LM015 สร้างกรดอินโดล-3-อะซีติกได้สูงสุด คือ 436.4 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชนิตา บุญมาก. 2552. ความหลากหลายของยีสต์ในน้ำและตะกอนดินจากป่าชายเลนบริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยตอนบน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริรัตน์ ศิริพรวิศาล. 2545. การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเมธิลโลโทรฟิเคียสต์เพื่อการผลิตเมทิลไฮดรอกซีอะซิเตสในเซลล์และการสะสมซิลิเนียมโดยเมธิลโลโทรฟิเคียสต์ที่กลายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาวิตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 2 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Meyers and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215: 403-410.

Azeredo, L.A.I., E.A.T. Gomes, L.C. Mendonca-Hagler and A.N. Hagler. 1998. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brasil. **Int. Microbiol.** 1: 205-208.

Baoguo, Z., Z. Hongxun, J. Bo, T. Ling, Y. Jianzhou, L. Baoju, Z. Guoqiang and B. Zhihui. 2008. Effect of cypermethrin insecticide on the microbial community in cucumber phyllosphere. **J. Environ. Sci.** 20: 1356-1362.

Barnett, J.A., R.W. Payne and D. Yarrow. 2000. **Yeasts : Characteristics and Identification, 3rd edition.** Cambridge University Press, Cambridge.

Dlauchy, D., J. Tornai-Lehoczki, L. Fulop and G. Peter. 2003. *Pichia (Komagataella) pseudopastoris* sp. nov., a new yeast species from Hungary. **Antonie van Leeuwenhoek.** 83: 327-332.

El-Tarabily, K.A. 2004. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **J. Appl. Microbiol.** 96: 69–75.

Fall, R. and A.A. Benson. 1996. Leaf methanol-the simplest natural product from plants. **Trends in plant science** 1: 1360-1385.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** 39: 783-791.

Fonseca, A. and J. Inacio. 2006. Phylloplane yeasts, pp. 263-301. In C. Rosa and G. Peter, eds. **Biodiversity and ecophysiology of yeasts.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Glickmann, E. and Y. Dessaux. 1994. A critical examination of the specificity of the Salkoski reagent for Indolic compounds produced by Phytopathogenic bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 793-796.

Glushakova, A.M., A.M. Yurkov and I.Yu. Chernov. 2006. Massive isolation of anamorphous ascomycetous yeasts *Candida oleophila* from plant phyllosphere. **Microbiology** 76: 799-803.

_____, I.A. Maximova, A.V. Kachalkin and A.M. Yurkov. 2010. *Ogataea cecidiorum* sp. nov., a methanool-assimilating yeast isolated from galls on willow leaves. **Antonie van Leeuwenhoek.** 98: 93-101.

Golubev, W.I. and J.P. Sampaio. 2009. New filobasidiaceous yeasts found in the phylloplane of a fern. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 55: 441-446.

_____, T. Sugita and N. Golubev. 2007. An ustilaginomycetous yeast, *Pseudozyma graminicola* sp. nov., isolated from the leaves of pasture plants. **Mycoscience** 48: 29-33.

- Guo, J.M., Y.Y. Xin and X.B. Yin. 2010. Selective differentiation of indoleacetic acid and indolebuteric acid using colorimetric recognition after Ehrlich reaction. **J. Agric. Food Chem.** 58: 6556–6561.
- Hartner, F.S. and A. Glieder. 2006. Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts. **Microbial Cell Factories** 5:39
- Inacio, J., L. Portugal, I. Spencer-Martins, A. Fonseca. 2005. Phylloplane yeasts from Portugal: Seven novel anamorphic species in the *Tremellales* lineage of the Hymenomycetes (Basidiomycota) producing orange-coloured colonies. **FEMS Yeast Res.** 5: 1167–1183.
- _____, P. Pereira, M. de Carvalho, A. Fonseca, M.T. Amaral-Collaco and I. Spencer-Martins. 2002. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in Mediterranean-Type ecosystem in Portugal. **Microb. Ecol.** 44: 344-353.
- Ji, Z-H. and F-Y. Bai. 2008. *Ogataea ganodermae* sp. nov., a methanol-assimilating yeast species isolated from basidiocarps of *Ganoderma* sp. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58: 1502-1506.
- Joshi, S.R. 2008. Influence of roadside pollution on the phylloplane microbial community of *Alnus nepalensis* (Betulaceae). **Rev. biol. Trop.** 56: 1521-1529.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol. Evol.** 16: 111-120.
- Komagata, K. and T. Nakase. 1967. Reitoshokuin no biseibutsu nikansuru kenkyu V. Shihan reituoshokushin yori bunri shita kobo no seijo (Microbiological study in foods. V. General properties of yeasts isolated from frozen foods) (in Japanese). **Shokuhin Eiseigaku Zasshi.** 8: 53–57.

Kurtzman, C.P. 1998. *Pichia* E. C. Hansen emend. Kurtzman, pp. 454-573. In C.P. Kurtzman and J.W. Fell, eds. **The yeasts, A taxonomic Study**, 4th edition. Elsevier, Amsterdam.

_____ and C.J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**. 73: 331-371.

_____ and _____. 2010. Systematics of methanol assimilating yeasts and neighboring taxa from multigene sequence analysis and the proposal of *Peterozyma* gen. nov., a new member of the *Saccharomycetales*. **FEMS Yeast Res.** 10: 353-361.

_____ and J.W. Fell. 1998. **The yeasts: A Taxonomic Study**, 4th edition. Elsevier Science, Amsterdam.

Landell, M.F., R. Billodre, J.P. Ramos, O. Leoncini, M.H. Vainstein and P. Valente. 2010. *Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov., novel yeasts species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brasil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 60: 244-248.

Limtong, S., N. Srisuk, W. Yongmanitchai, H. Kawasaki, H. Yurimoto, T. Nakase and N. Kato. 2004. Three new thermotolerant methylotrophic yeasts, *Candida krabiensis* sp.nov., *Candida sithepensis* sp. nov., and *Pichia siamensis* sp. nov., isolated in Thailand. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 50: 119–127.

_____, _____, _____, _____, _____, _____ and _____. 2008a. *Ogataea chonburiensis* sp. nov. and *Ogataea nakhonphanomensis* sp. nov., thermotolerant, methylotrophic yeast species isolated in Thailand, and transfer of *Pichia siamensis* and *Pichia thermomethanolica* to the genus *Ogataea*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58: 302-307.

- Limtong, S., N. Srisuk, W. Yongmanitchai, H. Yurimoto, T. Nakase and N. Kato. 2005. *Pichia thermomethanolica* sp. nov., a novel thermotolerant, methylotrophic yeast isolated in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 2225-2229.
- _____, Y. Imanishi, S. Jindamorakot, S. Ninomiya, W. Yongmanitchai and T. Nakase. 2008b. *Torulasporea maleeae* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species from Japan and Thailand. **FEMS Yeast Res.** 8: 337-343.
- Lindow, S.E. and M.T. Brandl. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 1875–1883.
- Lu, Q., L. Zhang, T. Chen, M. Lu, T. Ping and G. Chen. 2008. Identification and quantitation of auxins in plants by liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 22: 2565–2572.
- Mautone, J.N., M.F. Landell, A.M. Fuentefria and P. Valente. 2010. Phylloplane yeasts as a source of industrially interesting enzymes. **R. bras. Bioci.** 8: 169-173.
- Mccormack, J.P., H.G. Wildman and P. Jeffries. 1994. Production of Antibacterial Compounds by Phylloplane-Inhabiting Yeasts and Yeast like Fungi. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 927-931.
- Meyer, S.A., R.W. Payne and D. Yarrow. 1998. *Candida* Berkhout, pp. 454-573. In C.P. Kurtzman and J.W. Fell, eds. **The Yeasts, A Taxonomic Study**, 4th edition. Elsevier, Amsterdam.
- Morais, P.B., L.C.R.S. Teixeira, J.M. Bowles, M-A. Lachance and C.A. Rosa. 2004. *Ogataea falcaomoraisii* sp. nov. a sporogenous methylotrophic yeast from tree exudates. **FEMS Yeast Res.** 5: 81-85.

- Mujahid, Md., Ch. Sasikala and Ch. V. Ramana. 2011. Production of indole-3-acetic acid and related indole derivatives from L-tryptophan by *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 89: 1001-1008.
- Nagatsuka, Y., S. Saito and J. Sugiyama. 2008. *Ogataea neopini* sp. nov. and *O. corticis* sp. nov., with the emendation of the ascomycete yeast genus *Ogataea*, and transfer of *Pichia zsolttii*, *P. dorogensis*, and *P. trehaloabstinens* to it. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 54: 353-365.
- Nakase, T. and M. Suzuki. 1986. *Bullera megalospora*, a new species of yeast forming large ballistospores isolated from dead leaves of *Oryza sativa*, *Miscanthus sinensis* and *Sasa* sp. in Japan. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 32: 225-240.
- _____, F-L. Lee, S. Am-In, S. Jindamorakot, W. Potacharoen, M. Tanticharoen and M. Takashima. 2005. *Spolobolomyces fushanensis* sp. nov., a new species of ballistoconidium-forming yeast in the *Microbotryum* lineage isolated from a plant in Taiwan. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 51: 41-45.
- _____, S. Jindamorakot, S. Ninomiya, Y. Imanishi and H. Kawasaki. 2009. *Candida wancherniae* sp. nov. and *Candida morakotiae* sp. nov., two novel ascomycetous anamorphic yeast species found in Thailand. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 55: 93-100.
- _____, S. Ninomiya, Y. Imanishi, A. Nakagiri, H. Kawasaki and S. Limtong. 2008. *Ogataea paradorogensis* sp. nov., a novel methylotrophic ascomycetous yeast species isolated from galleries of ambrosia beetles in Japan, with a close relation to *Pichia doeogensis*. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 54: 377-383.
- _____, Y. Imanishi, S. Ninomiya and M. Takashima. 2010. *Candida rishirensis* sp. nov., a novel methylotrophic anamorphic yeast species isolated from soil on Rishiri Island in Japan. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 56: 169-173.

- Nassar, A.H., K.A. El-Tarabily and K. Sivasithamparam. 2005. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. **Biol. Fertil. Soils** 42: 97–108.
- Negluta, O., O. Csutak, I. Stoica and T. Vassu. 2010a. Identification of some methylotrophic yeast strains of biotechnological interest. **Rom. Biotechnol. Lett.** 15: 5159-5166.
- _____, _____, _____, E. Rusu and T. Vassu. 2010b. Methylotrophic yeasts: diversity and methanol metabolism. **Rom. Biotechnol. Lett.** 15: 5369-5375.
- Nemecek-Marshall, M., R.C. Macdonald, J.J. Franzen, C.L. Wojciechowski and R. Fall. 1995. Methanol emission from leaves. **Plant Physiol.** 108: 1359-1368.
- Nix-Stohr, S., L.L. Burpee and J.W. Buck. 2007. The Influence of Exogenous Nutrients on the Abundance of Yeasts on the Phylloplane of Turfgrass. **Microb. Ecol.** 55: 15–20.
- Peter, G., J. Tornai-Lehoczki and D. Dlačny. 2007. *Ogataea allantospora* sp. nov., an ascomycetous yeast species from phylloplane. **Antonie van Leeuwenhoek.** 92: 443–448.
- _____, _____ and _____. 2008. *Ogataea nitroaversa* sp. nov., a methylotrophic yeast species from temperate forest habitats. **Antonie van Leeuwenhoek.** 94: 217–222.
- _____, _____ and _____. 2009. *Ogataea populialbae* sp. nov., a yeast species from white poplar. **FEMS Yeast Res.** 9: 936-941.
- _____, _____, L. Fulop and D. Dlačny. 2003. Six new methanol assimilating yeast species from wood material. **Antonie van Leeuwenhoek.** 84: 147–159.
- Rosa, C. and G. Peter. 2006. Biodiversity and ecophysiology of Yeasts, pp. 263-301. In Fonseca, A. and J. Inacio, eds. **Phylloplane Yeasts.** Springer-Verlag, Berlin.

- Ruanpanum, P., N. Tangchitsomkid, K. D. Hyde and S. Lumyong. 2010. Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: screening of the effective biocontrol potential, indole-3-acetic acid and siderophore production. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 26: 1569-1578.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4: 406-425.
- Satyanarayana, T. and G. Kunze. 2009. **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications.** Springer Science and Business Media B.V.
- Scorzetti, G., J.W. Fell, A. Fonseca and A. Statzell-Tallman. 2002. Systematics of basidiomycetous yeast: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA region. **FEMS Yeast Res.** 2: 495-517.
- Shin, K-S., Y.K. Shin, J-H. Yoon and Y-H. Park. 2001. *Candida thermophila* sp. nov., a novel thermophilic yeast isolated from soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51: 1413-1417.
- Shokri, D. and G. Emtiazi. 2010. Indole-3-acetic acid (IAA) Production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by Taguchi Design. **Curr. Microbiol.** 61: 217-225.
- Suh, S-O and J.J. Zhou. 2010. Methylophilic yeasts near *Ogataea (Hansenula) polymorpha*: a proposal of *Ogataea angusta* comb. nov. and *Candida parapolyomorpha* sp. nov. **FEMS Yeast Res.** 10: 631-638.
- Takashima, M. and T. Nakase. 2000. Four new species of the genus *Sporobolomyces* isolated from leaves in Thailand. **Mycoscience.** 41: 357-369.

- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. **Nucleic Acids Res.** 25: 4876-4882.
- Valente, P., J.P. Ramos and O. Leoncini. 1999. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. **Can. J. Microbiol.** 45: 949-958.
- Van Dijken, J.P. and W. Harder. 1974. Optimal condition for the enrichment and isolation of methanol-assimilating yeast. **J. Gen. Microbiol.** 84: 409-411.
- Wang, Q.-M., J.-H. Jia, and F.-Y. Bai. 2006. *Pseudozyma hubeiensis* sp. nov. and *Pseudozyma shanxiensis* sp. nov., novel ustilaginomycetous anamorphic yeast species from plant leaves. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56: 289-293.
- _____, _____, and _____. 2008. Diversity of basidiomycetous phylloplane yeasts belonging to the genus *Dioszegia* (Tremellales) and description of *Dioszegia athyri* sp. nov., *Dioszegia butyracea* sp. nov. and *Dioszegia xingshanensis* sp. nov. **Antonie van Leeuwenhoek.** 93: 391–399.
- _____, S.-A. Wang, J.-H. Jia, and F.-Y. Bai. 2007. *Cryptococcus tibetensis* sp. nov., a novel basidiomycetous anamorphic yeast species isolated from plant leaves. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 53: 281–285.
- Weber, R.W.S., J. Becerra, M.J. Silva and P. Davoli. 2008. An unusual *Xanthophyllomyces* strain from leaves of *Eucalyptus globules* in Chile. **Mycol. Res.** 2: 861-867.
- Xin, G., D. Glawe and S.L. Doty. 2009. Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid producing yeasts occurring in *Populus* trees. **Mycol. Res.** 3: 973-980.

Yamada, Y. 1998. Identification of Coenzyme Q (Ubiquinone) homologs, pp. 101-102. In C.P. Kurtzman and J.W. Fell, eds. **The Yeasts, A Taxonomic Study**, 4th edition. Elsevier, Amsterdam.

_____ and K. Kondo. 1973. Coenzyme Q system in the classification of the yeast genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus* and the yeast like genera *Sporobolomyces* and *Rhodospiridium*. **Gen. Microbiol.** 19: 59-77.

Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts, pp. 77-100. In C.P. Kurtzman and J.W. Fell, eds. **The Yeasts, A Taxonomic Study**, 4th edition. Elsevier, Amsterdam.

Young, C.-C., P.D. Rekha, W.-A. Lai and A.B. Arun. 2006. Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. **Wiley InterScience** 10.



ภาคผนวก



อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract malt extract (YM) agar

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
มอลต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

2. Yeast extract malt extract broth

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
มอลต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

3. Yeast extract malt extract agar ที่เติมคลอแรมฟินิคอลและโซเดียมโทรฟิโอบีโตน

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
มอลต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
คลอแรมฟินิคอล	0.2	กรัม
โซเดียมโทรฟิโอบีโตน	0.25	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Yeast nitrogen base broth ที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

ยีสต์ไนโตรเจนเบส	6.7	กรัม
เมทานอล	5	มิลลิลิตร
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Yeast nitrogen base agar ที่มีเมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์

ยีสต์ไนโตรเจนเบส	6.7	กรัม
เมทานอล	5	มิลลิลิตร
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Yeast extract malt extract broth ที่มีสารละลายกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
มอลต์เอ็กซ์แทร็กต์	3	กรัม
เปปโทน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
กลีเซอรอล	100	มิลลิลิตร
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. Yeast extract peptone dextrose (YPD) broth ที่มีแอลทริปโตเฟน 0.1 เปอร์เซ็นต์

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	10	กรัม
เปปโทน	20	กรัม

กลูโคส	20	กรัม
แอลทริปโตเฟน	1	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

8. 5% malt extract agar

มอลต์เอ็กซ์แทร็กต์	50	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

9. Fowell's acetate agar

โซเดียมอะซิเตท	5	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

10. Corn meal agar

Corn meal agar	1.7	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

11. Gorodkova agar

กลูโคส	0.1	กรัม
เปปโตน	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.5	กรัม
วุ้น	2.0	กรัม

น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร
---------------------	-----	-----------

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

12. Stock carbon solution (10X)

ยีสต์ไนโตรเจนเบส (Difco)	6.7	กรัม
สารประกอบคาร์บอน	5	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน และเก็บในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

13. อาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ stock carbon solution (10X) ลงในหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งบรรจุน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-5 วัน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน การเตรียมอาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนนั้น มีสารประกอบคาร์บอน 7 ชนิด ที่ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดสอบ ได้แก่ อินูลิน เอทานอล เมทานอล แป้ง กาแลกทิทอล 2-คีโต-ดี-กลูโคเนตและ 5-คีโต-ดี-กลูโคเนต

14. Yeast carbon base (10X)

ยีสต์คาร์บอนเบส (Difco)	11.7	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

15. Yeast carbon base broth (1X)

เติม 0.2 มิลลิลิตร ของยีสต์คาร์บอนเบส (Difco) (10X) ลงในหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตรซึ่งบรรจุน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร

16. Stock nitrogen solution (10X)

ยีสต์คาร์บอนเบส (Difco)	11.7	กรัม
สารประกอบไนโตรเจน*	X	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอนและเก็บในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

สารประกอบไนโตรเจน*: แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ 0.5 กรัม โปแตสเซียมไนเตรด (KNO_3) 0.78 กรัม โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) 0.26 กรัม เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์ (ethylamine-HCl) 0.64 กรัม แอล-ไลซีน (L-lysine-HCl) 0.56 กรัม และคาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์ (cadaverinedihydrochloride) 0.68 กรัม

17. อาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

ชั่งวุ้น 1.67 กรัม ละลายในน้ำรีเวอร์สออสโมซิส 90 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รองน้ําอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เติม stock nitrogen solution (10X) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเทลงขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

18. Fermentation basal medium

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	4.5	กรัม
เปปโทน	7.5	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

บรอมไทมอลบลูจำนวนเล็กน้อยเพื่อให้มีสีเขียวเข้ม

แบ่ง fermentation basal medium ลงในหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งภายในมีหลอดดักแก๊ส หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ยกเว้นราฟฟิโนสใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์)

19. Fermentation test of glucose

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	4.5	กรัม
เปปโทน	7.5	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
บรอมไทมอลบลูจำนวนเล็กน้อยเพื่อให้มีสีเขียวเข้ม		

แบ่งใส่หลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งภายในมีหลอดดักแก๊ส หลอดละ 5 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

20. อาหารที่ปราศจากวิตามิน (vitamin free medium)

กลูโคส	10	กรัม
Vitamin assay casamino acids (Difco)	5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.1	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ปรับพีเอช 5.5 และฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

21. Custer's chalk medium

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์	5	กรัม
กลูโคส	50	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	5	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

เมื่ออุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ทำการเทลงบนเพลทที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเขย่าขวดเพื่อให้แคลเซียมคาร์บอเนตละลายเป็นเนื้อเดียวกับอาหาร

22. อาหารตรวจสอบความต้านทานไซโคลเฮกซิมิด์

1) การเตรียม Basal medium (10X)

ไซโคลเฮกซิมิด์ 1 กรัม ละลายในอะซิโตน 2.5 มิลลิลิตร

ยีสต์ไนด์โรเจนเบส (Difco) 6.7 กรัม

น้ำรีเวอร์สออสโมซิส 100 มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน

2) Active medium

เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ basal medium (10X) ลงในหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตรซึ่งบรรจุน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร

23. การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง

1) อาหารที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์

กลูโคส 50 กรัม

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์ 1 กรัม

วุ้น 1.3 กรัม

น้ำรีเวอร์สออสโมซิส 100 มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2) อาหารที่มีกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์

กลูโคส 60 กรัม

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์ 1 กรัม

วุ้น	1.3	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที		

3) อาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์	100	กรัม
กลูโคส	50	กรัม
ยีสต์ในโตรเจนเบส	6.7	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

4) อาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์	160	กรัม
กลูโคส	50	กรัม
ยีสต์ในโตรเจนเบส	6.7	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

24. Christensen's urea agar

1) การเตรียมสารละลายยูเรีย 20 เปอร์เซ็นต์

ยูเรีย	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร
ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน		

2) การเตรียมอาหารทดสอบการไฮโดรไลต์ยูเรีย

กลูโคส	1	กรัม
เปปโทน	1	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2	กรัม
วุ้น	20	กรัม
ฟีนอลเรด	0.012	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 6.8 แบ่งใส่หลอดละ 4.5 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายยูเรีย 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. Bromthymol blue stock solution

ละลายบรอมไทมอลบลู 50 มิลลิกรัม ในน้ำปริมาตร 75 มิลลิลิตร วิธีใช้ คือ เติม bromothymol blue stock solution ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงใน fermentation basal medium และ fermentation test of glucose ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. Lugol's solution

ไอโอดีน	1	กรัม
โปแตสเซียม ไอโอไดด์	2	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	300	มิลลิลิตร

3. Diazonium blue B reagent (DBB reagent)

Diazonium blue B salt	0.15	กรัม
0.25 M Tris hydroxymethyl aminomethane (pH 7.0)	10	มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมเสร็จแล้วควรเก็บไว้ในที่เย็น และใช้ภายใน 30 นาที หลังจากเตรียมเสร็จ

4. 50X TAE buffer

Tris base	48.4	กรัม
0.5M EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	11.5	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน โดยใช้ น้ำรีเวอร์สออสโมซิส ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. 10X TBE buffer

Tris base	10.8	กรัม
กรดบอริก	5.5	กรัม
0.5 mM EDTA (pH 8.0)	4.0	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากัน โดยใช้น้ำรีเวอร์สออสโมซิส ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Stock ethidium bromide

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำรีเวอร์สออสโมซิส 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชา และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. Loading dye

บรอมฟินอล บลู	0.25	กรัม
กลีเซอรอล	30	มิลลิลิตร
เติมน้ำรีเวอร์สออสโมซิสให้ครบ	100	มิลลิลิตร

8. 1 kb DNA ladder (DNA marker)

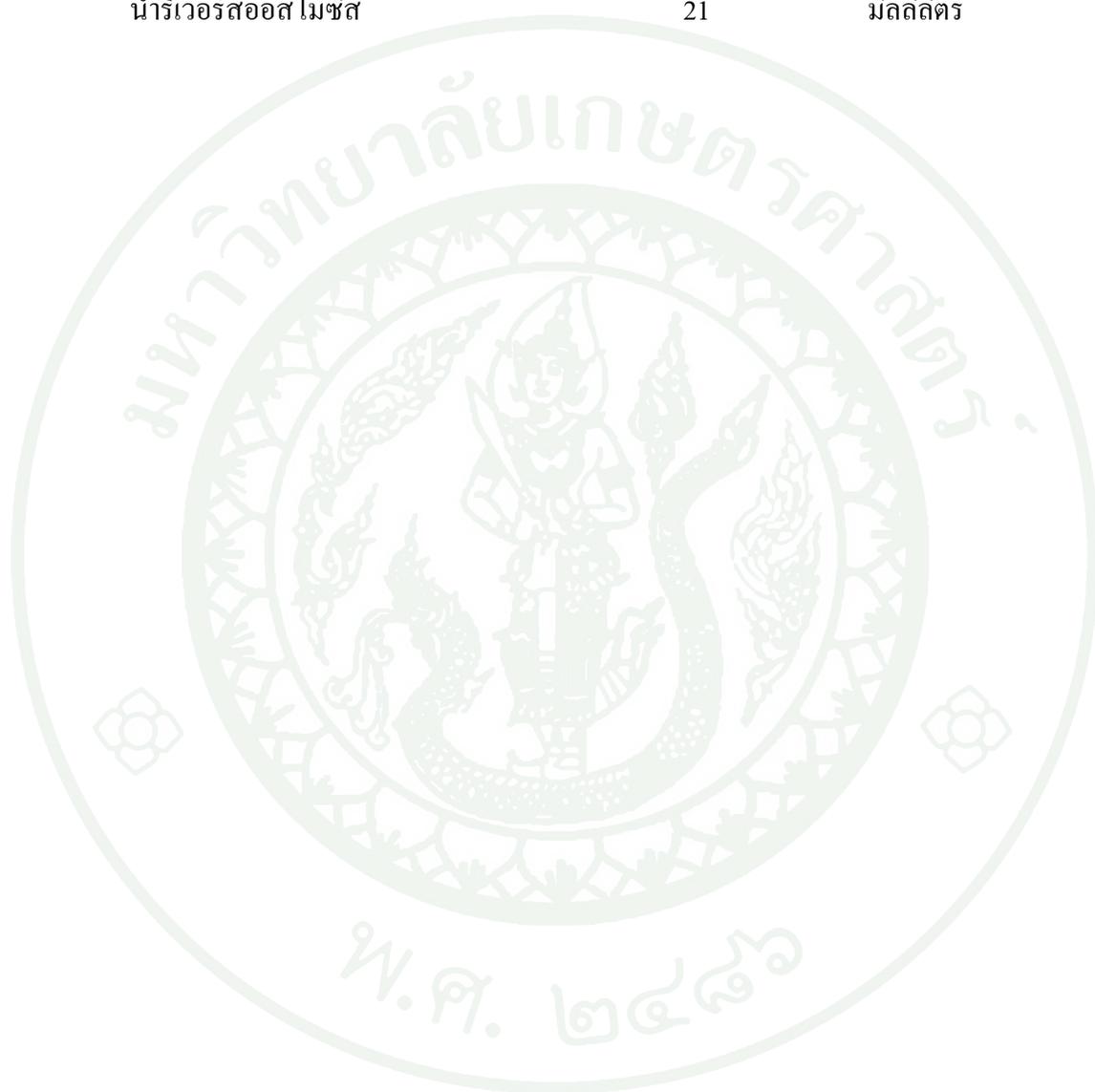
DNA ladder	1	ไมโครลิตร
6X loading Dye	1	ไมโครลิตร
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	4	ไมโครลิตร

9. 2.5 mM dNTP

dATP	25	ไมโครลิตร
dCTP	25	ไมโครลิตร
dGTP	25	ไมโครลิตร
dTTP	25	ไมโครลิตร
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	900	ไมโครลิตร

10. Salkowski reagent

Ferric-3-chloride	1.2	กรัม
Absolute sulfuric acid	79	มิลลิลิตร
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	21	มิลลิลิตร





Ogataea phyllophila sp. nov., *Candida chumphonensis* sp. nov. and *Candida mattranensis* sp. nov., three methylotrophic yeast species from phylloplane in Thailand

Nampueng Koowadjanakul · Sasitorn Jindamorakot ·
Wichien Yongmanitchai · Savitree Limtong

Received: 31 January 2011 / Accepted: 29 March 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract Five strains (LN12, LN14^T, LN15^T, LN16 and LN17^T) representing three novel methylotrophic yeast species were isolated from the external surface of plant leaves by three-consecutive enrichments. On the basis of morphological, biochemical, physiological and chemotaxonomic characteristics, the sequence analysis of the D1/D2 domain of the large subunit (LSU) rRNA gene and the phylogenetic analysis, the five strains were assigned to be one novel *Ogataea* species and two novel *Candida* species. Three strains (LN12, LN14^T and LN16) represent a single novel species of the genus *Ogataea*, for which the name *Ogataea phyllophila* sp. nov. is proposed. The type strain is LN14^T (= BCC 42666^T = NBRC 107780^T = CBS 12095^T). Strain LN15^T was assigned to be *Candida chumphonensis* sp. nov. (type strain

LN15^T = BCC 42667^T = NBRC 107781^T = CBS 12096^T). Strain LN17^T represented another novel species of *Candida* that was named *Candida mattranensis* sp. nov. (type strain LN17^T = BCC 42668^T = NBRC 107782^T = CBS 12097^T).

Keywords *Ogataea phyllophila* sp. nov. · *Candida chumphonensis* sp. nov. · *Candida mattranensis* sp. nov. · Methylotrophic yeast · Phylloplane

Introduction

Methylotrophic yeasts can utilize methanol as a sole source of carbon and energy. They represent a relative small proportion of yeasts and belong to a limited number of yeast genera, including *Ogataea* (Yamada et al. 1994; Mikata and Yamada 1995; Suh et al. 2006), *Komagataella* (Yamada et al. 1995; Dlauchy et al. 2003; Kurtzman 2005), *Kuraishia* (Yamada et al. 1994; Peter et al. 2005) and *Candida* (Meyer et al. 1998). In the recent years member of *Ogataea* increased rapidly not only because of transferring many *Pichia* species to this genus after emendation of the genus description for nitrate assimilation, ascospores shaped and ascospores number but also from discovering many novel species in the past few years (Glushakova et al. 2010; Kurtzman and Robnett 2010; Limtong et al. 2008; Nagatsuka

N. Koowadjanakul · W. Yongmanitchai ·
S. Limtong (✉)

Department of Microbiology, Faculty of Science,
Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand
e-mail: fscistl@ku.ac.th

S. Jindamorakot
Bioresources Technology Unit, National Center for
Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC),
Pathumthani, Thailand

S. Limtong
Center for Advanced Studies in Tropical Natural
Resources, National Research University-Kasetsart
University, Kasetsart University, Bangkok 10900,
Thailand

Published online: 10 April 2011

 Springer

et al. 2008; Peter et al. 2008, 2009; Suh and Zhou 2010). At present more than 30 species are accepted in the genus *Ogataea*.

The external surface of plant leaves usually refer to the phylloplane or phyllosphere (Phaff and Starmer 1987; Fonseca and Inacio 2006). Phylloplane from various regions of the world are found to be colonized by members of both basidiomycetous and ascomycetous yeasts (Fonseca and Inacio 2006; Glushakova et al. 2007; Landell et al. 2010; Nakase et al. 2001; Slavikova et al. 2009). Although most common phylloplane yeasts are basidiomycetous species (Fonseca and Inacio 2006; Nakase et al. 2001) Peter et al. (2007) reported the occurrence of methylotrophic ascomycetous species on leaves in Hungary. It is suggested that the methylotrophic yeasts on phylloplane utilize methanol that produced by pectin demethylation inside the leaves and emitted to the surface through stomata during transpiration for their growth (Peter et al. 2007).

During investigation of methylotrophic yeasts on phylloplane in Mattra island, Chumphon Islands National Park, Chumphon province, Thailand, five strains of novel species were isolated. Detailed analysis demonstrated that they are belonged to *Ogataea* clade. In this report one novel *Ogataea* species and two novels *Candida* species are described.

Materials and methods

Yeast isolation

Leaves were collected from 21 different plants included banana (*Musa sapientum*), cassava (*Manihot esculenta*), coconut (*Cocos nucifera*), fig (*Ficus racemosa*), sugarcane (*Saccharum officinarum*) and the other 16 unknown plants in a small area of primary rainforest in Mattra island (10°04'N 99°35'E), Chumphon Islands National Park, Chumphon province, Thailand in May, 2009. Methylotrophic yeasts were isolated by a technique involving three consecutive methanol enrichments as described by Limtong et al. (2004) but using 0.5% (v/v) methanol-yeast nitrogen base (YNB) broth (0.67% Difco yeast nitrogen base and 0.5% (v/v) methanol) instead of 1% (v/v) methanol-YNB broth. Three grams of cut leaves, derived from cutting few leaves to the size that can be put into a 250 ml Erlenmeyer flask, was inoculated

into 50 ml enrichment broth in the flask and incubated on a rotary shaker at room temperature for 4–5 days. After three consecutive enrichment cultivation a loopful of the enriched culture was streaked on 0.5% (v/v) methanol-YNB agar and incubated at room temperature until yeast colonies appeared. Yeast colonies of different morphologies were picked and purified by cross streaking on YM agar. Purified yeast strains were suspended in YM broth supplemented with 10% glycerol and maintained at -80°C .

DNA sequencing and phylogenetic analysis

Methods for DNA isolation and amplification of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene were as described previously by Limtong et al. (2007). The PCR product was checked by agarose gel electrophoresis and purified by using the QIA quick purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). The purified product was sequenced commercially by Macrogen Inc. (Seoul, Korea) for sequencing with primers, NL1 and NL4. The sequences were compared pairwise using a BLASTN search (Altschul et al. 1997) and were aligned with the sequences of related species retrieved from GenBank using the multiple alignment program CLUSTAL X version 1.81 (Thompson et al. 1997). A phylogenetic tree was constructed from the evolutionary distance data with Kimura's two-parameter correction (Kimura 1980), using the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987). The other phylogenetic trees were also constructed with the neighbor-joining and maximum likelihood methods using MEGA 5.0 package (Tamura et al. 2007) and the aligned sequences obtained from MUSCLE version 3.8 alignment program (Edgar 2004). Confidence levels of the clades were estimated from bootstrap analysis (1,000 replicates) (Felsenstein 1985).

Examination of taxonomic characteristics

The strains were characterized morphologically, biochemically, and physiologically according to the standard methods described by Yarrow (1998). Mycelium formation was investigated on corn meal agar in slide culture at 25°C for up to 7 days. Ascospores formation was investigated on 5% malt extract agar, Gorodkova agar, Fowell's acetate agar and corn meal agar at 15 and 25°C for up to 4 weeks.

Carbon assimilation tests were conducted in liquid medium as described by Yarrow (1998). Assimilation of nitrogen compounds was examined on solid media with starved inocula following the method of Nakase and Suzuki (1986). Growth at various temperatures was determined by cultivation in YM broth. Ubiquinones were extracted from cells cultivated in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 250 ml of yeast extract peptone dextrose (YPD) broth (1% yeast extract, 2% peptone and 2% dextrose) on a rotary shaker at 28°C for 24–48 h and purified according to the method described by Yamada and Kondo (1973) and Kuraishi et al. (1985). Isoprenologues were identified by HPLC as described previously (Limtong et al. 2007).

Results and discussion

Yeasts isolation and identification

Six methylotrophic yeast strains could be isolated by the enrichment isolation using 0.5% (v/v) methanol-YNB broth from six samples of leaves from cassava and the other five unknown plants out of 21 samples used for isolation. Identification on the basis of similarities of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene sequences revealed that five strains (LN12, LN14^T, LN15^T, LN16 and LN17^T) were found to represent three novel species and one strain was assigned to *Ogataea polymorpha*.

Member of the methylotrophic yeast have been found associated with plant materials including tree bark, tree exudate, flower, leaf, gall on leaf and rotten wood (Dlauchy et al. 2003; Glushakova et al. 2010; Limtong et al. 2004, 2008; Morais et al. 2004; Peter et al. 2003, 2007, 2008, 2009). The result of this investigation showed that methylotrophic yeasts were detected on leaves collected from the small island in Thailand though only a small number of samples were investigated. However, methylotrophic yeast could be detected on only 27% of the leaves which was much lower than 45% that was reported in Hungary (Peter et al. 2007) while 95% of leaves were colonized by the other yeasts.

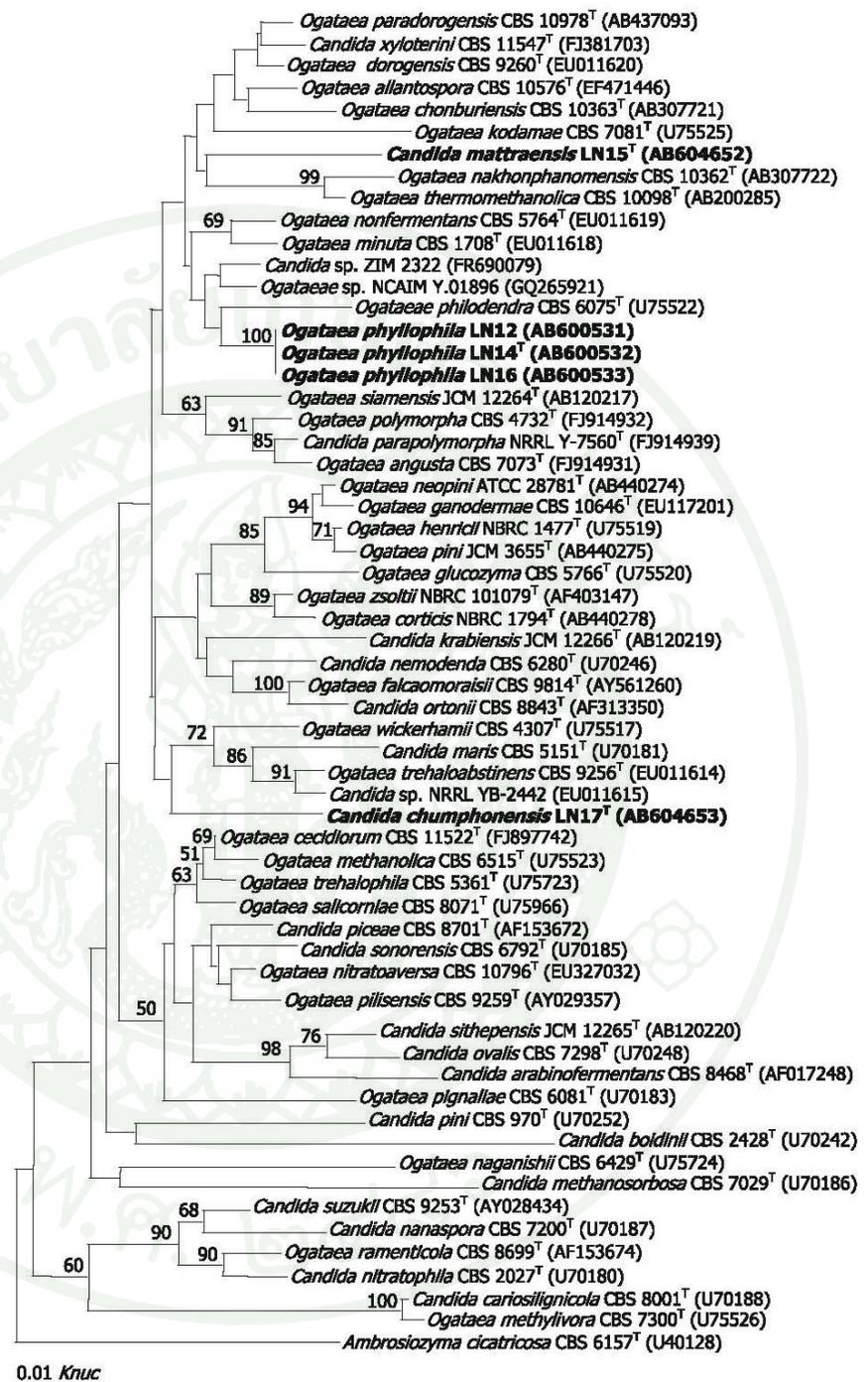
Novel species delineation

Among the five strains (LN12, LN14^T, LN15^T, LN16 and LN17^T), the sequences of the D1/D2 domain of

the LSU rRNA gene of three strains (LN12, LN14^T and LN16) were identical. In terms of pairwise sequence similarity the closest species to the three strains (LN12, LN14^T and LN16) was *Ogataea* sp. NCAIM Y.01896 but with 1.4% nucleotide substitutions (9 nucleotide substitutions out of 568 nt) and the three strains differed from *Ogataea minuta*, their closest described relative, by 1.8% nucleotide substitutions (10 nucleotide substitutions and 1 indel out of 567 nt). Strain LN15^T differed from *Candida* sp. ZIM 2322, its closest phylogenetic relative, by 2.8% nucleotide substitutions (18 nucleotide substitutions and 2 gaps out of 570 nt) and from *Ogataea dorogensis*, the known species closest to it, by 3.2% nucleotide substitutions (18 nucleotide substitutions and 3 gaps out of 570 nt). Strain LN17^T was closest to *Candida* sp. NRRL YB-2442 but with 3.5% nucleotide substitutions (20 nucleotide substitutions and 1 indel out of 566 nt) while it differed by 3.7% nucleotide substitutions (21 nucleotide substitutions and 1 indel out of 566 nt) from *Ogataea cecidiorum*, its closest known species. Therefore, the three strains (LN12, LN14^T and LN16) were considered to represent a single novel species while strains LN15^T and LN17^T represented two other novel species (Kurtzman and Robnett 1998).

The phylogenetic trees based on the sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene were constructed by neighbor-joining method using the aligned sequences obtained from CLUSTAL X alignment program (Fig. 1) or MUSCLE alignment program (data not shown) and by maximum likelihood method using the aligned sequences obtained from either alignment program (data not shown). Though the trees constructed by both methods were not congruent completely, they demonstrated that the five strains were in the *Ogataea* clade. The neighbor-joining tree using aligned sequences obtained from CLUSTAL X alignment program was selected to show the phylogenetic placement of the new species (Fig. 1). In this neighbor-joining tree the five strains were in the same cluster that separated from the so-called *Pichia methanolica* cluster proposed by Nagatsuka et al. (2008), which latter the *Pichia* species of this cluster were transferred to the genus *Ogataea* (Kurtzman and Robnett 2010). The three strains (LN12, LN14^T and LN16) were located in the same position and formed a subcluster with *Ogataea* sp. NCAIM Y.01896 and *O. minuta*, their closest

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene, showing positions of *Ogataea phyllophila* sp. nov. (LN12, LN14^T and LN16), *Candida chumphonensis* sp. nov. (LN15^T) and *Candida matranensis* sp. nov. (LN17^T) with respect to closely related species. The phylogenetic tree was constructed from evolutionary distance data corrected by two-parameter transformation of Kimura (1980), using the neighbor-joining method. Numbers indicate percentages of bootstrap sampling, derived from 1,000 samples. Bar 0.01 *Knuc*



undescribed and described relatives in term of pairwise sequence similarity, but with low bootstrap support. Strain LN15^T form a subcluster with

O. dorogenis with low bootstrap support its closet described species. Strain LN17^T was related to *Candida* sp. NRRL YB-2442 in a separate subcluster.

Therefore, it is clear that the five strains were separated into three novel species belonging to the *Ogataea* clade but their correct phylogenetic position within the clade remains unclear which was also happened in the case of using single gene sequences for phylogenetic tree construction reported by Nagatsuka et al. (2008); Nakase et al. (2010) and Peter et al. (2010).

On the basis of the evidence of molecular and other taxonomic criteria here we propose three novel species, *O. phyllophila* sp. nov. (Mycobank no.: MB561002) for strains LN12, LN14^T and LN16, *C. chumphonensis* sp. nov. (Mycobank no.: MB561003) for strain LN15^T, and *C. mattranensis* sp. nov. (Mycobank no.: MB561004) for strain LN17^T.

The three novel species *O. phyllophila* sp. nov., *C. chumphonensis* sp. nov. and *C. mattranensis* sp. nov. can be distinguished from each other and from their closest known species *O. minuta*, *O. dorogensis* and *O. cecidiorum*, respectively, not only on the basis of the sequences of the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene and ascospores formation but also by several phenotypic characteristics as shown in Table 1.

**Latin diagnosis of *Ogataea phyllophila*
Koowadjanakul, Jindamorakot,
Yongmanitchai et Limtong sp. nov.**

In medio liquido ‘cum extracto levidins et extracto malti (YM)’, post dies 3 ad 25°C cellulae globosae aut ovoideae (2–3 × 2–4 μm), singulae aut binae, per germinationem multipolarem reproducentes. In agar ‘YM’, post dies 3 ad 25°C, cultura butyrosa, crenea, glabra et margo glabra. Pseudohyphae et hyphae non formantur in agar farina Zea mays post dies 7 ad 25°C. Ascospores galeiformes aut pileiformes, 4 in ascum. Asci inconjugati, conjugati cellularum vel conjugati cellularum gemmarum que oriuntur. Fermentatio nulla. D-Glucosum, L-sorboseum, D-ribosum, D-xylosum (lente), D-arabinosum (infirmum), α-α-trehalosum, cellobiosum, salicinum, glycerolum, erythritolum, ribitolum, D-glucitolum, D-mannitolum, acidum 2-keto-D-gluconicum (infirmum), acidum 5-keto-D-gluconicum, acidum DL-lacticum (infirmum), acidum succinicum, acidum citricum, methanolum, ethanolum, natrium nitrosus, kalium nitricum, ethylaminum, L-lysinum et cadaverinum assimilantur at non D-galactosum, N-acetyl-D-glucosaminum,

Table 1 Phenotypic characteristics of *Ogataea phyllophila* sp. nov., *Candida chumphonensis* sp. nov., *Candida mattranensis* sp. nov., *Ogataea minuta*, *Ogataea dorogensis* and *Ogataea cecidiorum*

Characteristics	1	2	3	4 ^a	5 ^b	6 ^c
Fermentation						
D-Glucose	–	S	W	+/W/–	S	S
D-Galactose	–	–	–	–	–	–
Maltose	–	–	–	–	–	–
Sucrose	–	–	–	–	–	–
α-α-Trehalose	–	–	–	W/S	–/W/S	–
Lactose	–	–	–	–	–	N
Raffinose	–	–	–	–	–	–
Carbon assimilation						
D-Glucose	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	–	–	W	–	–	–
L-Sorbose	+	–	S	–	+	+
N-Acetyl-D-glucosamine	–	–	–	–	–	N
D-Ribose	+	W	S	±	+	+
D-Xylose	S	–	W	±	+	V
L-Arabinose	–	–	–	–	L	V
D-Arabinose	W	–	–	V/S	+	V
L-Rhamnose	–	–	–	V/±	–	W
Sucrose	–	–	–	–	–	–
Maltose	–	–	–	–	–	–
α-α-Trehalose	+	–	+	+	+	+
α-Methyl-D-glucoside	–	–	–	–	–	+
Cellobiose	+	W	+	+/S	+	–
Salicin	+	W	+	+	+	N
Melibiose	–	–	–	–	–	–
Lactose	–	–	–	–	–	–
Raffinose	–	–	–	–	–	–
Melezitose	–	–	–	–	–	–
Inulin	–	W	–	–	–	–
Soluble starch	–	–	–	–	–	–
Glycerol	+	W	+	+/S	+	+
Erythritol	+	W	+	–	+	+
Ribitol	+	W	+	+	+	+
D-Glucitol	+	W	+	+	+	N
D-Manitol	+	W	+	+	+	N
Galactitol	–	–	+	–	–	N
Myo-inositol	–	–	–	–	–	–
2-Keto-D-gluconic acid	W	W	–	–	–	–
5-Keto-D-gluconic acid	+	+	–	–	N	–
D-Gluconic acid	–	W	–	V/–	–	N
D-Glucuronic acid	–	–	–	–	–	–
DL-Lactic acid	W	–	W	–	–	–
Succinic acid	+	W	+	V/+/S	+	V
Citric acid	+	–	+	S/+	+	–

Table 1 continued

Characteristics	1	2	3	4 ^a	5 ^b	6 ^c
Methanol	+	+	+	+	+	+
Ethanol	+	W	+	+/W	+	+
Nitrogen assimilation						
Potassium nitrate	+	-	+	V/±	-	+/W
Sodium nitrite	+	-	+	±	-	N
Ethylamine HCl	+	+	+	+	+	N
L-Lysine HCl	+	-	+	+	+	+
Cadaverine HCl	+	+	+	+	+	N
Additional growth tests						
Vitamin-free	W	W	+	-	-	+
Growth at 25°C	+	+	+	+	N	+
Growth at 30°C	+	+	+	+	+	+
Growth at 35°C	+	+	+	+	+	-
Growth at 37°C	-	-	S	±	+	-
Growth at 40°C	-	-	-	±	+/W	-
Growth at 42°C	-	-	-	-	N	-
Growth at 45°C	-	-	-	-	-	-
0.01% Cycloheximide	-	-	-	+	N	+
0.1% Cycloheximide	-	-	-	+	+	+
50% Glucose	+	-	+	-	-	W
60% Glucose	-	-	+	-	N	N
10% NaCl/5% glucose	+	-	+	V	-	-
16% NaCl/5% glucose	-	-	-	-	-	N
Amyloid formation	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-
Diazonium blue B	-	-	-	-	-	-
Major ubiquinone	Q7	Q7	Q7	Q7	Q7	N

1 *O. phyllophila* sp. nov., 2 *C. chumphonensis* sp. nov., 3 *C. matranensis* sp. nov., 4 *O. minuta*, 5 *O. dorogensis*, 6 *O. cecidiorum*, + positive, S slow positive, W weak positive, V variable, L latent, - negative, N no data

^a Data from Kurtzman (1998) and Barnett et al. (2000)

^b Data from Peter et al. (2003)

^c Data from Glushakova et al. (2010)

L-arabinosum, L-rhamnosum, sucrosus, maltosus, α -methyl-D-glucosidus, melibiosus, lactosus, raffinosus, melizitosus, inulinus, amylo solubilis, galactitolus, inositolus, acidus D-gluconicus nec acidus D-glucuronicus. Vitamina externa ad crescentiam necessaria non sunt (infirme). Crescere potest in temperatura 25, 30 et 35°C at non crescit in temperatura 37, 40, 42 nec 45°C. Crescit in 50% glucosus, et 10% NaCl/5% glucosus. Non crescit in 60% glucosus, 16% NaCl/5% glucosus, 0.1% cycloheximido et 0.01% cycloheximido. Amylo non formatur. Diazonium caeruleum B non

respondens. Ureum non hydrolysatur. Ubiquinonum majus: Q-7.

Holotypus

Stirps LN14^T isolatus ex folio, in Chumphon provincia, Thailandia. Cultura et conservatus in Collectione Culturarum in BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailandia ut BCC 42666^T; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japonia conservatus ut NBRC 107780^T et Centraal-bureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands ut CBS 12095^T.

**Description of *Ogataea phyllophila*
Koowadjanakul, Jindamorakot,
Yongmanitchai and Limtong sp. nov.**

Growth in yeast extract malt extract (YM) broth: After 3 days at 25°C, cells are spherical to ovoid (2–3 × 2–4 μ m) and occur singly or in pairs (Fig. 2a). Budding is multilateral. Growth on YM agar: After 3 days at 25°C, the streak culture is butyrous, cream-coloured, with a smooth surface and has an entire margin. Pseudohyphae and true hyphae are not formed in slide culture on corn meal agar after 7 days at 25°C. Ascospores were produced on 5% malt extract agar and corn meal agar after 2 days at 15 and 25°C (Fig. 2b). Four hat-shaped ascospores are formed in a deliquescent ascus that may be produced unconjugation or conjugation between a parent cell and its bud or between independent cells and ascospores tend to agglutinate after liberation. The other phenotypic characteristics of the species are shown in Table 1. The MycoBank number is MB561002.

Holotype

LN14^T is the holotype of *O. phyllophila*. The strain was isolated from leaves of an unknown tree on Mattra island (10°04'N 99°35'E) in Chumphon Islands National Park, Chumphon province, Thailand, collected in May, 2009. The living culture from type was

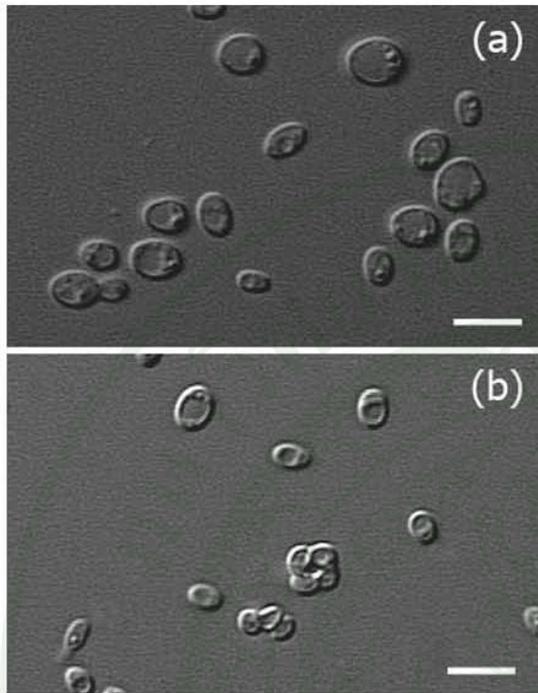


Fig. 2 *Ogataea phyllophila* sp. nov. (LN14^T) **a** Budding cells on YM agar after 3 days at 25°C and **b** hat-shaped ascospores formed on corn meal agar after 3 days at 25°C. Scale bar 5 µm

deposited at the BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailand, as BCC 42666^T; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan, as NBRC 107780^T and Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands as CBS 12095^T.

Etymology

The species epithet *phyllophila* refers to phylloplane where the three strains of this species were isolated.

Latin diagnosis of *Candida chumphonensis* Limtong, Koowadjanakul, Jindamorakot et Yongmanitchai sp. nov.

In medio liquido 'YM', post dies 3 ad 25°C cellulae globosae aut ovoideae (2–4 × 2–4 µm),

singulae, binae, aut congregationibus, per germinationem multipolarem reproducentes. In agaro 'YM', post dies 3 ad 25°C, cultura butyrosa, crenea, glabra, umbonatus et margo undulata. Pseudohyphae et hyphae non formantur. Ascosporae non formantur. D-Glucosum (lente) fermentature at non D-galactosum, maltosum, sucrosus, α-α-trehalosum, lactosum nec raffinose. D-Glucosum, D-ribosum (infirmum), cellobiosum (infirmum), salicinum (infirmum), inulinum (infirmum), glycerolum (infirmum), erythritolum (infirmum), ribitololum (infirmum), D-glucitololum (infirmum), D-mannitololum (infirmum), acidum 2-keto-D-gluconicum (infirmum), acidum 5-keto-D-gluconicum, acidum D-gluconicum (infirmum), acidum succinicum (infirmum), methanololum, ethanololum (infirmum), ethylaminolum et cadaverinum assimilantur at non D-galactosum, L-sorbose, N-acetyl-D-glucosaminolum, D-xylosum, L-arabinosum, D-arabinosum, L-rhamnosum, sucrosus, maltosum, α-α-trehalosum, α-methyl-D-glucosidum, melibiosum, lactosum, raffinose, melizitosum, amyllum solubile, galactitololum, inositololum, acidum D-gluconicum, acidum DL-lacticum, acidum citricum, kalium nitricum, natrium nitrosolum nec L-lysinolum. Vitamina externa ad crescentiam necessaria non sunt (infirmum). Crescere potest in temperatura 25, 30 et 35°C at non crescit in temperatura 37, 40, 42 nec 45°C. Non crescit in 50% glucosum, 60% glucosum, 10% NaCl/5% glucosum, 16% NaCl/5% glucosum, 0.1% cycloheximido et 0.01% cycloheximido. Amyllum non formatur. Diazonium caeruleum B non respondens. Ureum non hydrolysat. Ubiquinolum majus: Q-7.

Holotypus

Stirps LN15^T isolatus ex folio, in Chumphon provincia, Thailandia. Cultura et conservatus in Collectione Culturarum in BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailandia ut BCC 42667^T; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japonia conservatus ut NBRC 107781^T et Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands ut CBS 12096^T.

Description of *Candida chumphonensis* Limtong, Koowadjanakul, Jindamorakot and Yongmanitchai sp. nov.

Growth in YM broth: After 3 days at 25°C, cells are spherical to ovoid (2–4 × 2–4 μm) and occur singly or in pairs or in groups (Fig. 3a). Budding is multilateral. Growth on YM agar: After 3 days at 25°C, the streak culture is butyrous, cream-coloured, with an umbonate surface and has an undulate margin. Pseudohyphae and true hyphae are not formed in slide culture on corn meal agar after 7 days at 25°C. Ascospores were not produced on 5% malt extract agar, Fowell's acetate agar, Gorodkova agar and corn meal agar after 4 weeks at 15 and 25°C. The other phenotypic characteristics of the species are shown in Table 1. The MycoBank number is MB561003.

Holotype

LN15^T is the holotype of *C. chumphonensis*. The strain was isolated from leaves of an unknown tree on

Mattra island (10°04'N 99°35'E) in Chumphon Islands National Park, Chumphon province, Thailand, collected in May, 2009. The living culture from type was deposited at the BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailand, as BCC 42667^T; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan, as NBRC 107781^T and Centraalbureau voor Schimmelmcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands as CBS 12096^T.

Etymology

The species epithet *chumphonensis* refers to Chumphon province, Thailand, where the strain was isolated.

Latin diagnosis of *Candida mattranensis* Limtong, Koowadjanakul, Jindamorakot et Yongmanitchai sp. nov.

In medio liquido 'YM', post dies 3 ad 25°C cellulae subglobosae aut ovoideae (1–4 × 2–5 μm), singulae aut binae, per germinationem multipolarem reproductentes. In agarō 'YM', post dies 3 ad 25°C, cultura butyrosa, cremea, glabra et margo glabra. Pseudohyphae et hyphae non formantur. Ascospores non formantur. D-Glucosum (infirme) fermentature at non D-galactosum, maltosum, sucrosam, α-α-trehalosum, lactosum nec raffinolum. D-Gucosum, D-galactosum (infirme), L-sorbosum (lente), D-ribosum (lente), D-xylosum (infirme), α-α-trehalosum, cellobiosum, salicinum, glycerolum, erythritolum, ribitolum, D-glucitolum, D-mannitolum, galactitolum, acidum DL-lacticum (infirme), acidum succinicum, acidum citricum, methanolum, ethanolum, kalium nitricum, natrium nitrosum, ethylaminum, L-lysinum et cadaverinum at non N-acetyl-D-glucosaminum, L-arabinosum, D-arabinosum, L-rhamnosum, sucrosam, maltosum, α-methyl-D-glucosidum, melibiosum, lactosum, raffinolum, melizitosum, inulinum, amyllum solubile, inositolum, acidum 2-keto-D-gluconicum, acidum 5-keto-D-gluconicum, acidum D-gluconicum nec acidum D-glucuronicum. Vitamina externa ad crescentiam necessaria non sunt. Crescere potest in temperatura 25, 30, 35 et 37°C (lente) at non crescit

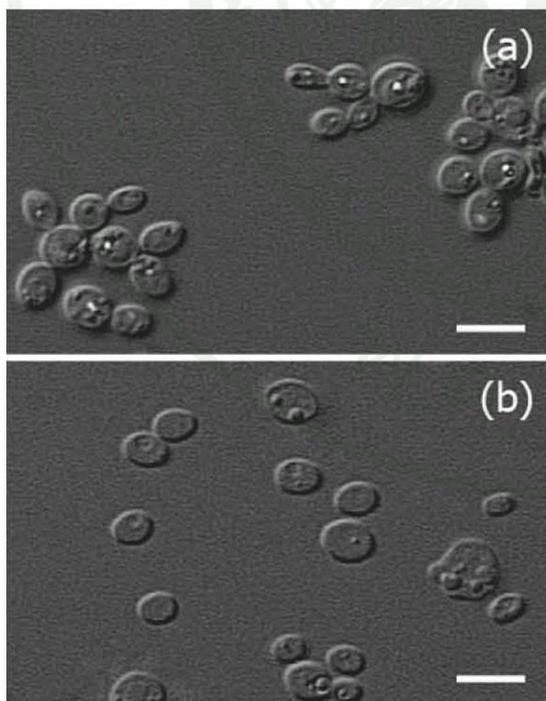


Fig. 3 Budding cells on YM agar after 3 days at 25°C of **a** *Candida chumphonensis* sp. nov. (LN15^T) and **b** *Candida mattranensis* sp. nov. (LN17^T). Scale bar 5 μm

in temperatura 40, 42 nec 45°C. Crescit in 50% glucosum, 60% glucosum et 10% NaCl/5% glucosum. Non crescit in 16% NaCl/5% glucosum, 0.1% cycloheximido et 0.01% cycloheximido. Amylum non formatur. Diazonium caeruleum B non respondens. Ureum non hydrolysat. Ubiquinonum majus: Q-7.

Holotypus

Stirps LN17^T isolatus ex folio, in Chumphon provincia, Thailandia. Cultura et conservatus in Collectione Culturarum in BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailandia ut BCC 42668^T; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japonia conservatus ut NBRC 107782^T et Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands ut CBS 12097^T.

Description of *Candida mattranensis* Limtong, Koowadjanakul, Jindamorakot and Yongmanitchai sp. nov.

Growth in YM broth: After 3 days at 25°C, cells are subspherical to ovoid (1–4 × 2–5 μm) and occur singly or in pairs (Fig. 3b). Budding is multilateral. Growth on YM agar: After 3 days at 25°C, the streak culture is butyrous, cream-coloured, with a smooth surface and has an entire margin. Pseudohyphae and true hyphae are not formed in slide culture on corn meal agar after 7 days at 25°C. Ascospores were not produced on 5% malt extract agar, Fowell's acetate agar, Gorodkova agar and corn meal agar after 4 weeks at 15 and 25°C. The other phenotypic characteristics of the species are shown in Table 1. The MycoBank number is MB561004.

Holotype

LN17^T is the holotype of *C. mattranensis*. The strain was isolated from leaves of an unknown tree on Mattra island (10°04'N 99°35'E) in Chumphon Islands National Park, Chumphon province, Thailand, collected in May, 2009. The living culture from type was deposited at the BIOTEC Culture Collection

(BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, Thailand, as BCC 42668^T; NITE Biological Resources Center (NBRC), Department of Biotechnology, National Institute of Technology and Evaluation, Chiba, Japan, as NBRC 107782^T and Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, the Netherlands as CBS 12097^T.

Etymology

The species epithet *mattranensis* refers to Mattra island, Chumphon province, Thailand, where the strain was isolated.

Acknowledgments This work was partially supported by the Thailand Graduate Institute of Science and Technology (TGIST) grant TGIST 01-52-030. The authors would like to thank Assoc Prof Dr Hiroya Yurimoto, Laboratory of Microbial Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University for allowing to use the microscope for taking yeast micrographs.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer JZ, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (2000) *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge
- Dlauchy D, Tornai-Lehoczki J, Fulop L, Peter G (2003) *Pichia (Komatagaella) pseudopastoris* sp. nov., a new yeast species from Hungary. *Antonie van Leeuwenhoek* 83:327–332
- Edgar PC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acid Res* 32:1792–1797
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Fonseca A, Inacio J (2006) Phylloplane yeasts. In: Rosa C, Peter G (eds) *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, pp 263–301
- Glushakova AM, Yurkov AM, Chernov IY (2007) Massive isolation of anamorphous ascomycete yeasts *Candida oleophila* from plant phyllosphere. *Microbiology* 76:799–803
- Glushakova AM, Maximova IA, Kachalkin AV, Yurkov AM (2010) *Ogataea cecidiorum* sp. nov., a methanol-assimilating yeast isolated from galls on willow leaves. *Antonie van Leeuwenhoek* 98:93–101
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120
- Kuraishi H, Katayama-Fujimura Y, Sugiyama J, Yokoyama T (1985) Ubiquinone systems in fungi. I. Distribution of

- ubiquinones in the major families of ascomycetes, basidiomycetes, and deuteromycetes, and their taxonomic implications. *Trans Mycol Soc Jpn* 26:383–395
- Kurtzman CP (1998) *Pichia* E. C. Hansen emend Kurtzman. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The yeasts, a taxonomic study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp 273–352
- Kurtzman CP (2005) Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:973–976
- Kurtzman CP, Robnett CJ (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 CP, Robnett CJ (2010) Systematics of methanol assimilating yeasts and neighboring taxa from multigene sequence analysis and the proposal of *Peterozyma* gen. nov., a new member of the *Saccharomycetales*. *FEMS Yeast Res* 10:353–361
- Landell MF, Billodre R, Ramos JP, Leoncini O, Vainstein MH, Valente P (2010) *Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov., novel yeast species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:244–248
- Limtong S, Srisuk N, Yongmanitchai W, Kawasaki H, Yurimoto H, Nakase T, Kato N (2004) Three new thermotolerant methylotrophic yeasts, *Candida krabiensis* sp. nov., *Candida sithepensis* sp. nov., and *Pichia siamensis* sp. nov., isolate in Thailand. *J Gen Appl Microbiol* 50:119–127
- Limtong S, Yongmanitchai W, Tun MM, Kawasaki H, Seki T (2007) *Kazachstania siamensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species from forest soil in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:419–422
- Limtong S, Srisuk N, Yongmanitchai W, Yurimoto H, Nakase T (2008) *Ogataea chonburiensis* sp. nov. and *Ogataea nakhonphanomensis* sp. nov., thermotolerant, methylotrophic yeast species isolated in Thailand, and transfer of *Pichia siamensis* and *Pichia thermomethanolica* to the genus *Ogataea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:302–307
- Meyer SA, Payne RW, Yarrow D (1998) *Candida* Berkhout. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The yeasts, a taxonomic study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp 454–573
- Mikata K, Yamada Y (1995) *Ogataea kodamae*, a new combination for a methanol-assimilating yeast species, *Pichia kodamae* van der Walt et Yarrow. *Res Commun Inst Ferment* 17:99–101
- Morais PB, Teixeira LCRS, Bowles JM, Lachance M-A, Rosa CA (2004) *Ogataea falcaomoraisii* sp. nov., a sporogenous methylotrophic yeast from tree exudates. *FEMS Yeast Res* 5:81–85
- Nagatsuka Y, Saito S, Sugiyama J (2008) *Ogataea neopini* sp. nov. and *O. corticis* sp. nov., with the emendation of the ascomycete yeast genus *Ogataea*, and transfer of *Pichia zsolttii*, *P. dorogensis*, and *P. trehaloabstinens* to it. *J Gen Appl Microbiol* 54:353–365
- Nakase T, Suzuki M (1986) *Bullera megalospora*, a new species of yeast forming large ballistospores isolated from dead leaves of *Oryza sativa*, *Miscanthus sinensis* and *Sasa* sp. in Japan. *J Gen Appl Microbiol* 32:225–240
- Nakase T, Takashima M, Itoh M, Fungsin B, Potacharoen W, Athasampunna P, Komagata K (2001) Ballistoconidium-forming yeasts found in the phyllosphere of Thailand. *Microbiol Cult Coll* 17:23–33
- Nakase T, Imanishi Y, Ninomiya S, Takashima M (2010) *Candida rishirensis* sp. nov., a novel methylotrophic anamorphic yeast species isolated from soil on Rishiri Island in Japan. *J Gen Appl Microbiol* 56:169–173
- Peter G, Tornai-Lehoczki J, Fulop L, Dlačuchy D (2003) Six new methanol assimilating yeast species from wood material. *Antonie van Leeuwenhoek* 84:147–159
- Peter G, Dlačuchy D, Tornai-Lehoczki J, Kurtzman CP (2005) *Kuraishia molischiana* sp. nov., the teleomorph of *Candida molischiana*. *Antonie van Leeuwenhoek* 88:241–247
- Peter G, Tornai-Lehoczki J, Dlačuchy D (2007) *Ogataea allantospora* sp. nov., an ascomycetous yeast species from phylloplane. *Antonie van Leeuwenhoek* 92:443–448
- Peter G, Tornai-Lehoczki J, Dlačuchy D (2008) *Ogataea nitratroaversa* sp. nov., a methylotrophic yeast species from temperate forest habitats. *Antonie van Leeuwenhoek* 94:217–222
- Peter G, Tornai-Lehoczki J, Dlačuchy D (2009) *Ogataea populiabae* sp. nov., a yeast species from white poplar. *FEMS Yeast Res* 9:936–941
- Peter G, Tornai-Lehoczki J, Dlačuchy D (2010) *Ogataea pignaliae* sp. nov., the teleomorph of *Candida pignaliae*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2496–2500
- Phaff HJ, Starmer WT (1987) Yeasts associated with plants, insects and soil. In: Rose AH, Harrison JS (eds) *The yeasts*, 2nd edn. Academic, London, pp 123–180
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Slavikova E, Vadkertiova R, Vranova D (2009) Yeasts colonizing the leaves of fruit trees. *Ann Microbiol* 59:419–424
- Suh S-O, Zhou JJ (2010) Methylotrophic yeasts near *Ogataea (Hansenula) polymorpha*: a proposal of *Ogataea angusta* comb. nov. and *Candida parapolyomorpha* sp. nov. *FEMS Yeast Res* 10:631–638
- Suh SO, Blackwell M, Kurtzman CP, Lachance M-A (2006) Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the ascomycete yeasts. *Mycologia* 98:1006–1017
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24:4876–4882
- Yamada Y, Kondo K (1973) Coenzyme Q system in the classification of the yeast genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus*, and the yeast-like genera *Sporobolomyces* and *Rhodospiridium*. *J Gen Appl Microbiol* 19:59–77
- 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 (*Saccharomycetales*): the proposal of three new genera, *Ogataea*, *Kuraishia*, and *Nakazawaea*. *Biosci Biotechnol Biochem* 58:1245–1257

Yamada Y, Matsuda M, Maeda K, Mikata K (1995) The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (Saccharomycetaceae). *Biosci Biotechnol Biochem* 59:439–444

Yarrow D (1998) Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The yeasts, a taxonomic study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp 77–100



ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวน้ำผึ้ง คุ้มจันกุล
เกิดวันที่	6 มีนาคม 2530
สถานที่เกิด	อำเภอหนองหาน จังหวัดอุดรธานี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนต้นที่โรงเรียนเซนต์เมรี่ เกรดเฉลี่ย 3.39 มัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนอุดรพิทยานุกูล เกรดเฉลี่ย 3.39 ระดับปริญญาตรีที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา เกรดเฉลี่ย 3.17
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนจากโครงการสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) เป็นระยะเวลา 2 ปี (พ.ศ. 2552-2554)
ประวัติการฝึกงานและประสบการณ์การทำงาน	เข้ารับการฝึกงานในโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา เป็นระยะเวลานาน 3 สัปดาห์