



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



รายงานการวิจัย

ความหลากหลายของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้ง
ของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

(Yeast Species Diversity in Soils Collected from the Mixed Deciduous
and the Dry Evergreen Forests in Mae Wong National Park)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์¹

รองศาสตราจารย์ ดร. รสริน ว่องวิไลรัตน์¹

นายสุธน เวียงดาว²

1 ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์/สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้าน
ความหลากหลายทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2 หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ปีที่พิมพ์ 2558



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



รายงานการวิจัย

ความหลากหลายของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้ง
ของอุทยานแห่งชาติแม่วังก์

(Yeast Species Diversity in Soils Collected from the Mixed Deciduous
and the Dry Evergreen Forests in Mae Wong National Park)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์¹

รองศาสตราจารย์ ดร. รสริน ว่องวิไลรัตน์¹

นายสุธน เวียงดาว²

1 ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์/สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้าน
ความหลากหลายทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

2 หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วังก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ปีที่พิมพ์ 2558



กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ที่กรุณาสับสนุนและอนุญาตให้เข้าศึกษาวิจัยในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงแห่งหนึ่งของประเทศ ณ อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในการสำรวจเบื้องต้น เพื่อศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งเป็นฐานข้อมูลแรกที่บ่งบอกสถานะของยีสต์ซึ่งเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตสำคัญในระบบนิเวศป่าไม้ของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยเฉพาะในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้ง

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
สัญญาเลขที่ กบง./2556-33

คณะผู้วิจัย



บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยใช้เทคนิค culture-dependent เพื่อบ่งบอกความหลากหลายชนิดของยีสต์ และประเมินบทบาทเชิงนิเวศของยีสต์ในดินป่าธรรมชาติของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยนำดินตัวอย่างมาคัดแยกยีสต์โดยใช้อาหารเหลวและอาหารแข็ง acidified yeast extract malt extract ที่เติมคลอแรมเฟนิคอลเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดโพธิ์ไอโอนิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเป็น 3.7 คัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้ง จำนวน 16 และ 29 สายพันธุ์ ตามลำดับ ผลการพิสูจน์เพื่อระบุชื่อชนิดของยีสต์โดยใช้หลักการ phylogenetic identification พบว่า ยีสต์ 16 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินป่าเบญจพรรณ เป็นยีสต์ที่มีความแตกต่างกัน 11 ชนิด คือ *Candida albicans*, *C. diversa*, *C. maltosa*, *Galactomyces geotrichum*, *Kloeckera apiculata*, *Millerozyma phetchabunensis*, *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus*, *Tetrapisispora namnaonensis* และ *T. phaffii* และยีสต์ 29 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินป่าเบญจพรรณ เป็นยีสต์ที่มีความแตกต่างกัน 13 ชนิด คือ *C. albicans*, *C. diversa*, *Debaryomyces hansenii*, *G. geotrichum*, *Geotrichum candidum*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania humatica*, *Kloeckera lindneri*, *P. kluyveri*, *S. cerevisiae*, *T. namnaonensis*, *T. phaffii* และ *Yarrowia lipolytica* ความหลากหลายชนิดของยีสต์ทั้งหมดมีผลต่อการทำหน้าที่ในระบบนิเวศป่าไม้ของยีสต์ คือ การย่อยสลายอินทรีย์สารผ่านกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน/ไม่ใช้ออกซิเจนและการหมัก การช่วยละลายหินฟอสเฟต บทบาทในวัฏจักรคาร์บอน วัฏจักรไนโตรเจน วัฏจักรออกซิเจน วัฏจักรไฮโดรเจน วัฏจักรฟอสฟอรัส และวัฏจักรซัลเฟอร์ การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช การสร้างสารปรับสภาพโครงสร้างดิน และการเป็นอาหารให้แก่สิ่งมีชีวิตอื่นที่เป็นผู้ล่า

คำสำคัญ

ความหลากหลายชนิดของยีสต์, ดินป่าไม้, เทคนิค Culture-dependent, เทคนิค Culture-independent, อุทยานแห่งชาติแม่วงก์



Abstract

Based on culture-dependent and culture-independent techniques, analysis of yeast species diversity in the mixed deciduous and the dry evergreen forest soils collected from Mae Wong National Park was carried out in order to investigate the species diversity of yeast and evaluate the ecological roles of yeasts found in forest soils. Using of acidified yeast extract malt extract agar/broth supplemented with 200 mg/l of chloramphenicol and 0.1 % of propionic acid, 16 and 29 yeast strains were isolated from soils of the mixed deciduous and the dry evergreen forests, respectively. On the basis of comparative D1/D2 sequences of 26S rDNA, 16 yeast strains isolated from the mixed deciduous forest soils belonged to 11 species such as *Candida albicans*, *C. diversa*, *C. maltosa*, *Galactomyces geotrichum*, *Kloeckera apiculata*, *Millerozyma phetchabunensis*, *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus*, *Tetrapisispora namnaonensis* and *T. phaffii*, and 29 yeast strains isolated from the dry evergreen forest soils belonged to 13 species, including *C. albicans*, *C. diversa*, *Debaryomyces hansenii*, *G. geotrichum*, *Geotrichum candidum*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania humatica*, *Kloeckera lindneri*, *P. kluyveri*, *S. cerevisiae*, *T. namnaonensis*, *T. phaffii* และ *Yarrowia lipolytica*. The ecological roles of yeasts in forest ecosystem are concluded, such as decomposition of organic materials via respiration and fermentation, solubilization of insoluble phosphates, nutrient transformation via carbon, nitrogen, oxygen, hydrogen, phosphorus and sulfur cycles, enhancement of plant growth, plant protection from microbial plant pathogens, improvement of soil structure, and feed of many species of bacteria, fungi and protozoa.

Key words

Yeast species diversity, Forest soil, Culture-dependent technique, Culture-independent technique, Mae Wong National Park



สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	1-1
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1-3
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	1-5
ผลการวิจัย	1-8
อภิปรายและวิจารณ์ผล	1-19
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	1-22
บรรณานุกรม	1-25
คณะผู้วิจัย	1-29



บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยมีจุดตั้งทางภูมิศาสตร์ที่เหมาะสมในระหว่างเส้นรุ้งที่ 5 องศา 40 ลิบดา ถึง 20 องศา 35 ลิบดาเหนือ และเส้นแวงที่ 93 องศา 30 ลิบดา ถึง 105 องศา 40 ลิบดาตะวันออก ทำให้สภาพภูมิอากาศของประเทศไทยเกิดขึ้นจากการสร้างสภาวะสมดุลของพลังงานในเขตร้อนกับเขตหนาวในแถบขั้วโลกเหนือ กอปรกับสภาพภูมิประเทศประกอบด้วยเทือกเขาสูงสลับซับซ้อนในภาคเหนือ เป็นที่ราบในตอนกลางของประเทศ และมีแนวสันเขาต่อเนื่องจากซีกตะวันตกลงไปจนสุดภาคใต้ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นที่ราบสูง และลาดลงสู่แม่น้ำโขง ปัจจัยเหล่านี้ทำให้เกิดความแปรผันขึ้นในแต่ละพื้นที่ทำให้เกิดสภาพภูมิอากาศเฉพาะถิ่น (micro-climate) ซึ่งเมื่อผนวกกับสภาพของดินที่เกิดจากวัสดุต้นกำเนิด (parent materials) ที่แตกต่างกัน ส่งผลให้เกิดความหลากหลายของชนิดป่าไม้ในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย

ระบบนิเวศป่าไม้ (Forest Ecosystem) ของประเทศไทยมีความซับซ้อนทางด้านกายภาพและชีวภาพสูง เป็นผลจากความผันแปรของปัจจัยแวดล้อมต่างๆ เช่น ปริมาณน้ำฝนที่เกิดจากลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ ลมจากร่องความกดอากาศ และลมใต้ฝุ่น ความชื้นในบรรยากาศ อุณหภูมิ ฤดูกาล สภาพทางธรณีวิทยา และสภาพของไฟป่า ด้วยปัจจัยต่างๆเหล่านี้ทำให้สิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศป่าไม้ของประเทศไทยถูกคาดหวังว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ทั้งในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ความหลากหลายของชนิดหรือสปีชีส์ (species diversity) และความหลากหลายของระบบนิเวศ (ecological diversity) จากข้อมูลพื้นฐานของการศึกษาในด้านต่างๆที่เกี่ยวข้องทำให้นักวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพประมาณการว่าจากจำนวนสิ่งมีชีวิตทั้งหมดบนโลกที่มีประมาณ 5 ล้านชนิด จำนวนประมาณ 350,000 ชนิด พบอยู่ในประเทศไทย ดังนั้นประเทศไทยจึงนับได้ว่ามีความร่ำรวยอย่างมากในด้านความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในส่วนของจุลินทรีย์คาดว่าจะมีในประเทศไทยถึง 200,000 ชนิด หรือมากกว่า อย่างไรก็ตาม ประมาณ 1 ใน 10 ส่วนของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่านั้นที่มีการศึกษาและรายงานผลการวิจัยทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ทำให้จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่คาดว่าจะมีในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศป่าไม้ของเมืองไทยที่มีความอุดมสมบูรณ์และถูกกันเป็นพื้นที่อนุรักษ์ ซึ่งกระจายอยู่ตามเขตอุทยานแห่งชาติ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า ยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างจริงจัง และไม่มีรายงานการวิจัยเผยแพร่ออกมา ซึ่งเมื่อพิจารณาจากการที่ประเทศไทยมีการสูญเสียพื้นที่ป่าไม้เป็นจำนวนมหาศาล ในช่วง 30 ปีที่ผ่านมาจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากสาเหตุสำคัญหลายประการด้วยกัน เช่น การเพิ่มของประชากรทำให้มีการบุกรุกป่าเพิ่มขึ้นเพื่อเป็นที่อยู่อาศัยและทำการเกษตรกรรม การให้สัมปทานป่าไม้ที่ขาดการควบคุมอย่างเพียงพอ การตัดถนนเข้าสู่พื้นที่ป่า การเกษตรเชิงอุตสาหกรรม ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีที่ใช้ในการทำลายป่า และการครอบครองที่ดินเพื่อเก็งกำไร เป็นต้น จากสาเหตุดังกล่าวเหล่านี้ ทำให้อัตราการคุกคามต่อความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย โดยเฉพาะความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์เพิ่มสูงมากขึ้นเรื่อยๆ หากขาดการศึกษาในด้านความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว และเป็นระบบตามหลักการทางวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง ผลกระทบที่ตามมาคือ ประเทศไทยจะสูญเสียชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายในด้านพันธุกรรมไปอย่างไม่สามารถที่จะประเมินค่าได้ ทั้งที่ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ดังกล่าว



สามารถนำมาศึกษาวิจัยเพื่อประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ด้านการเกษตร อุตสาหกรรม การแพทย์ และสิ่งแวดล้อม อันจะนำมาซึ่งการยกระดับคุณภาพชีวิตของประชากรในประเทศไทยโดยรวมในที่สุด

ในช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตในประเทศไทยได้รับความสนใจอย่างมาก อย่างไรก็ตามโครงการที่ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์โดยเฉพาะความหลากหลายของยีสต์ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์มีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในช่วงที่ผ่านมาเน้นไปที่ culturable strains โดยใช้ culture-dependent technique ดังนั้นการประเมินความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในแหล่งอาศัยต่างๆจึงไม่ครอบคลุมชนิด (species) และจำนวนยีสต์ที่มีอยู่อย่างแท้จริง ประมาณการว่า จำนวนชนิดของ unculturable yeasts อาจสูงมากกว่า ๙๐ เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนชนิดของยีสต์ทั้งหมดที่พบในแหล่งอาศัยนั้นๆ ส่งผลให้ขาดข้อมูลสำคัญอีกด้านที่จำเป็นต่อการวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพที่แท้จริงของยีสต์ในแต่ละแหล่งอาศัย ส่งผลให้การจัดการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมของยีสต์อย่างเป็นระบบเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในอนาคต รวมถึงขาดการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆเพื่อการแยก unculturable yeasts ที่มีอยู่จำนวนมาก และมีความหลากหลายของพันธุกรรมและชนิดสูงจากแหล่งอาศัยดังกล่าว จากปัญหาข้างต้นคณะผู้วิจัยเห็นว่าการนำเอาเทคนิคทันสมัย เช่น เทคนิค Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงมาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่า ร่วมกับ culture-dependent method จะทำให้ทราบถึงจำนวน และชนิดของยีสต์ทั้งหมดในแหล่งอาศัยดังกล่าว รวมทั้งสามารถแยก และรวบรวมสายพันธุ์ยีสต์ที่เป็น culturable yeast strains ซึ่งสามารถนำมาศึกษาถึงการใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ อุตสาหกรรม เกษตรกรรม และสิ่งแวดล้อม ส่งผลให้การจัดการทรัพยากรพันธุกรรมของยีสต์ที่พบในดินป่าไม้ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ เช่น ป่าอนุรักษ์ในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นระบบมากยิ่งขึ้น อันจะส่งผลต่อการใช้ประโยชน์ทรัพยากรยีสต์อย่างยั่งยืนในอนาคต สิ่งสำคัญที่สุดในการศึกษาดังกล่าวคือการบุกเบิกงานวิจัยด้านความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าธรรมชาติที่พบในพื้นที่อุทยานแห่งชาติ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าของประเทศไทยโดยอาศัยเทคนิคสมัยใหม่ คือ เทคนิค DHPLC ร่วมกับ culture-dependent method ซึ่งสามารถทำให้ทราบข้อมูลด้านความหลากหลายชนิดที่แท้จริงของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้ง โดยเฉพาะในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ที่ประกอบด้วยพื้นที่ป่าเบญจพรรณ (๕๙ เปอร์เซ็นต์) และดินป่าดิบแล้ง (๒๒ เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นผืนป่าธรรมชาติที่มีความอุดมสมบูรณ์ในเขตภาคเหนือตอนล่าง โดยเฉพาะจังหวัดนครสวรรค์และกำแพงเพชร ผลของการทราบข้อมูลด้านความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จะทำให้สามารถวิเคราะห์และเข้าใจถึงบทบาทของยีสต์ในดินป่าธรรมชาติที่มีต่อระบบนิเวศป่าไม้ ในเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติดังกล่าว ซึ่งจะเป็นองค์ความรู้ใหม่เสริมความรู้ความเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับนิเวศวิทยาของยีสต์ที่ส่วนใหญ่เป็นรายงานเกี่ยวกับบทบาทในฐานะยีสต์เป็นผู้ย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ในระบบนิเวศ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของวัฏจักรธาตุอาหารหลักและรองที่จำเป็นต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในระบบนิเวศ นอกจากนี้บทบาทหลักดังกล่าวยีสต์มีความสามารถในการสร้าง growth factors ที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย อาร์เคีย ราและเห็ดที่อาศัยในแหล่งอาศัยต่างๆในระบบนิเวศป่าไม้ รวมทั้งบทบาทยีสต์ในการสร้างฮอร์โมนพืช เช่น ออกซิน (auxin) เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีสต์ที่เป็น rhizospheric yeasts ผลจากการศึกษาวิจัยตามโครงการวิจัยที่เสนอในครั้งนี้จะได้รับข้อมูลด้านความหลากหลายชนิดและบทบาทเชิงนิเวศวิทยาของยีสต์ในดินป่าไม้ ซึ่งเป็นองค์ความรู้ใหม่ด้านจุลชีววิทยาป่าไม้ และเป็นฐานข้อมูลที่สำคัญในการศึกษาความหลากหลาย



ชนิดและบทบาทเชิงนิเวศวิทยาของยีสต์ในระบบนิเวศป่าไม้เป็นอย่างดีในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่ป่าอนุรักษ์ในเขตอุทยานแห่งชาติและเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าที่มีความสมบูรณ์ของระบบนิเวศป่าไม้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาและวิเคราะห์ความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ด้วยเทคนิค DHPLC ร่วมกับ culture-dependent method
2. เพื่อให้ได้องค์ความรู้ในด้านความหลากหลายชนิดและบทบาทเชิงนิเวศวิทยาของยีสต์ในระบบนิเวศป่าไม้ คือ ป่าเบญจพรรณ และป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

คณะผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
และสถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ต. ท่าโพธิ์ อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055 96 2336 มือถือ 082 341 3330
E-mail: tawatchais@nu.ac.th
2. รองศาสตราจารย์ ดร. รสริน ว่องวิไลรัตน์
ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
และ สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ต. ท่าโพธิ์ อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055 96 2336 มือถือ 091 842 1576
E-mail: rosarinw@nu.ac.th
3. นายสุธน เวียงดาว
หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์



บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ (yeast diversity) หมายถึง คุณสมบัติของกลุ่มหรือชนิดของยีสต์ที่มีความหลากหลายในระดับพันธุกรรมหรือยีน (genetic diversity) ความหลากหลายชนิด (species diversity) จนถึงความหลากหลายของแหล่งอาศัยในเชิงนิเวศวิทยา (ecological diversity) ยีสต์เป็นเชื้อราที่เซลล์ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular fungi) พบได้ทั่วไปในแหล่งอาศัยตามธรรมชาติ เช่น ดิน อากาศ น้ำ สัตว์ และพืช (do Carmo-Sousa, 1978; Spencer and Spencer, 1997; Luong *et al.*, 2000; Nakase, 2000) ดินเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่น่าสนใจของยีสต์ เนื่องจากดินอุดมไปด้วยสารอาหารมากมายหลายชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์โดยกิจกรรมของแบคทีเรีย อาร์เคีย รา เส้นใยและยีสต์ชนิดต่างๆ รวมทั้งสิ่งมีชีวิตอื่นในดิน ผลของการใช้สารอาหารดังกล่าวทำให้ยีสต์สามารถผลิตสารเมแทบอไลต์ที่สำคัญ เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ และก๊าซหลายชนิด เป็นต้น ที่มีผลในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์หลายกลุ่ม ทั้งกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobes) กลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (anaerobes) และกลุ่มที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) (Reith *et al.*, 2002) นอกจากนี้พบยีสต์ในบางสกุล เช่น *Candida*, *Cerinosterus*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hormonema*, *Hortaea*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula* และ *Trichosporon* มีความสามารถในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ เนื่องจากยีสต์เหล่านี้มีกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด เช่น เซลลูเลส (cellulase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) เพคตินเนส (pectinase) โปรติเอส (protease) และไลเปส (lipase) เป็นต้น (Middelhoven, 1997; Scorzetti *et al.*, 2000; Middelhoven *et al.*, 2001) ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษาพบว่า ยีสต์หลายชนิด เช่น *Aureobasidium pullulans*, *Citeromyces matritensis*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis* และ *Sporobolomyces roseus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (McCormack *et al.*, 1994)

ความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยทางด้านกายภาพและชีวภาพของดิน เช่น ชนิด ความอุดมสมบูรณ์ สภาวะความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ความชื้น และสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆในดิน (Slavikova and Vadkertiova, 2000) ยีสต์บางชนิด เช่น *Debaryomyces occidentalis*, *Lipomyces starkeyi*, *L. lipofera*, *L. kononenkoeae*, *L. tertrasporus*, *L. anomalus*, *Schizoblastosporion starkeyi-henricii*, *Sporobolomyces salmonicolor* และยีสต์หลายชนิดในสกุล *Cryptococcus* และ *Rhodotorula* เป็นยีสต์ที่พบได้ทั่วไปในดิน (Spencer and Spencer, 1997) ในอดีตการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินโดยทั่วไปมักเป็นการศึกษายีสต์ที่อาศัยอยู่ในดินที่เก็บจากแหล่งต่างๆในหลายภูมิภาคของโลกที่มีความแตกต่างกันในด้านลักษณะของภูมิอากาศและภูมิประเทศ (Goto *et al.*, 1987; van der Walt *et al.*, 1994; Kurtzman, 2001) ในส่วนของการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินที่ทำการเก็บรวบรวมมาจากพื้นที่ป่าอนุรักษ์ยังมีอยู่น้อยมาก เช่น Slavikova and Vadkertiova (2000) ศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ที่อาศัยอยู่ในดินของป่าผลัดใบ (deciduous forest) และป่าสน (coniferous forest) ในประเทศสโลวาเกีย พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในดินของป่าทั้งสองชนิด ส่วนใหญ่เป็นยีสต์ในกลุ่ม basidiomycetous yeasts คือ



Cryptococcus laurentii, *C. albidus*, *C. macerans*, *C. terreus*, *Cystofilobasidium capitatum*, *Leucosporidium scottii*, *Rhodotorula aurantiaca*, *R. glutinis*, *R. rubra*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Trichosporon cutaneum* และ *T. pullulans* สำหรับยีสต์ส่วนน้อยที่พบเป็น นียีสต์ในกลุ่ม ascomycetous yeasts คือ *Candida famata*, *Debaryomyces castellii*, *D. polymorphus*, *Kloeckera apis* และ *Pichia americana* ในปีต่อมา Polyakova et al. (2001) ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในดินที่มีความชื้นสูงที่เก็บในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ในเขต Western Siberia และ Hummocky Tundra Region ที่ Cape Borrow (Alaska) พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในดินเป็นยีสต์ในกลุ่ม basidiomycetous yeasts เช่นเดียวกัน โดยชนิดที่พบบ่อยคือ *Cryptococcus albidus*, *C. gilvoscens* และ *Rhodotorula mucilaginosa* สำหรับยีสต์ในกลุ่ม ascomycetous yeasts ที่พบคือ *Candida paludigena* และ *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าของอุทยานแห่งชาติในประเทศออสเตรเลียที่พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในดินเป็นยีสต์กลุ่ม basidiomycetous yeasts โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Cryptococcus* หลายชนิด (Wuczkowski and Prillinger, 2004) ในประเทศไทยการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในดินป่าธรรมชาติในเขตอุทยานแห่งชาติ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าของประเทศไทยอย่างเป็นระบบมีรายงานครั้งแรกโดย Sumpradit (2005) ซึ่งศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในดินที่เก็บจากป่าดิบเขา ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าสนของอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว โดยใช้ cultivation-based technique หรือ culture-dependent method โดยเริ่มจากการแยกยีสต์จากดินตัวอย่างโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งมีผลในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญของยีสต์ และมีการเติมสารที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราเส้นใยที่มีอยู่จำนวนมากในดินตัวอย่าง สำหรับการพิสูจน์เพื่อระบุชนิดของยีสต์ ทำโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ซึ่งยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ และมีความจำเพาะในยีสต์แต่ละชนิด ทั้งนี้ยีสต์ต่างชนิดกันจะมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินโดยใช้ culture-dependent method ดังกล่าวมีข้อด้อยในส่วนที่ไม่สามารถศึกษายีสต์สายพันธุ์ที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ จากการประมาณการของนักอนุกรมวิธานของเชื้อรา พบว่ามีเพียง 17 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราทั้งหมดที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ (Bridge and Spooner, 2001) และจากจำนวนของยีสต์ที่มากกว่า 1,000 ชนิด ที่ได้รับการค้นพบและมีรายงานการศึกษาในปัจจุบันคิดเป็นจำนวนเพียง 1-10 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ทั้งหมดที่มีอยู่ตามแหล่งที่อยู่อาศัยชนิดต่างๆบนโลก (Fell et al., 2000) ดังนั้นการใช้ culture-dependent method เพียงเทคนิคเดียวในการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดิน โดยเฉพาะในดินของป่าธรรมชาติที่มีความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ชนิดต่างๆ จึงไม่สามารถทำให้ทราบถึงความหลากหลายชนิดที่แท้จริงของยีสต์ที่อาศัยอยู่ในดินป่าไม้ ดังนั้นผู้วิจัยเห็นว่าการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าไม้ด้วย DNA-based/culture-independent method คือ Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) ร่วมกับ culture-dependent method จะทำให้ทราบถึงความหลากหลายชนิดที่แท้จริงของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ได้เป็นอย่างดี

สำหรับเทคนิค DHPLC เป็นเทคนิคทันสมัยที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษา microbial communities โดย Barlaan et al. (2005) เป็นคณะผู้วิจัยกลุ่มแรกที่ประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าวในการศึกษา bacterial community ของ marine bacteria ซึ่งผลจากการทดลองพบว่า ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ความหลากหลายชนิดของ



marine bacteria ซึ่งมี PCR-amplified 16S rDNA ของ marine bacteria หลายชนิดรวมกัน เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DHPLC สามารถพบแต่ละ peak เป็นตัวแทนของ PCR-amplified 16S rDNA ของ marine bacteria ต่างชนิดกัน เทคนิค DHPLC เป็นเทคนิคที่ผสมผสานระหว่างเทคนิค denaturing DNA กับ reversed phase HPLC โดยเทคนิค denaturing DNA เป็นเทคนิคที่อาศัยความร้อนเพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจน ส่งผลให้ดีเอ็นเอสายคู่กลายเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ส่วนเทคนิค reversed phase HPLC เป็นเทคนิคการแยกสารที่อาศัยส่วนของ stationary phase ในคอลัมน์เป็นส่วนที่ไม่มีขั้ว และส่วนของ mobile phase เป็นส่วนที่มีขั้ว เมื่อสารตัวอย่างมีความเป็นขั้วสูงจะถูกชะล้างออกจากคอลัมน์ได้เร็วกว่าสารที่มีขั้วน้อยกว่าหรือไม่มีขั้วเลย จึงสามารถแยกสารต่างๆออกจากกันได้ ส่วนเทคนิค DHPLC จะมีส่วนของ stationary phase ที่ประกอบไปด้วยอนุภาค alkylated nonporous polystyrene-divinylbenzene ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 ไมครอน เป็นอนุภาคที่ไม่มีขั้วและมีคุณสมบัติเป็น hydrophobic ส่วน mobile phase ที่ใช้ได้แก่ Buffer A ประกอบด้วย 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) ในน้ำบริสุทธิ์ ใช้ในการปรับปริมาตรการไหลเข้าของ Buffer B เข้าสู่ระบบ สำหรับ Buffer B ประกอบด้วย 0.1 M TEAA กับ acetonitrile (ปริมาตรสุดท้าย 25 เปอร์เซ็นต์) หน้าที่ของ TEAA นั้นจะเป็นตัวกลางในการจับดีเอ็นเอไว้กับส่วนของ stationary phase ไว้ ซึ่งเรียกคุณสมบัตินี้ว่า ion-pairing reagent โดยประจุบวกบนหมู่ ammonium ในโมเลกุลของ TEAA จะจับกับประจุลบของหมู่ฟอสเฟตในสายดีเอ็นเอ ในขณะที่เดียวกันด้านที่มี alkyl chain จะไปจับ (interact) กับส่วนที่เป็น hydrophobic บนผิวหน้าของ stationary phase เมื่อมีปริมาณการไหลเข้าของ Buffer B น้อย ปริมาณ acetonitrile ในระบบจะน้อยไปด้วย แรงผลักรวมกันของประจุลบที่เกิดจากโมเลกุลของ acetonitrile ต่อการผลักรวมกันของดีเอ็นเอจะน้อย จนไม่สามารถทำลายแรงจับระหว่าง TEAA กับดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอยังคงติดอยู่ในส่วนของ stationary phase แต่เมื่อมีการค่อยๆเพิ่มปริมาณการไหลเข้าของ Buffer B ในระบบ หรือ increasing gradient ของ Buffer B ซึ่งหมายถึง ปริมาณของ acetonitrile ที่เพิ่มขึ้น ทำให้แรงผลักรวมกันของประจุลบในโมเลกุลของ acetonitrile มากขึ้น จนความเข้มข้นของ acetonitrile ถึงจุดๆหนึ่งซึ่งแรงประจุลบของ acetonitrile มีแรงผลักรวมกันมากกว่าแรงจับของดีเอ็นเอกับ TEAA เป็นผลทำให้สายดีเอ็นเอหลุดออกมาจากส่วนของ stationary phase และถูกชะออกจากคอลัมน์ในที่สุด ปัจจุบันอีกปัจจัยหนึ่งที่ถือได้ว่ามีบทบาทที่สำคัญที่สุดในการวิเคราะห์สายดีเอ็นเอ โดยเทคนิค DHPLC คือ อุณหภูมิที่อยู่ในช่วง 50-70 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิจะมีผลต่อโครงสร้างของดีเอ็นเอ ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณ G+C หรือ mol% G+C ของสายดีเอ็นเอที่สนใจ อุณหภูมิจะไปมีผลทำให้โครงสร้างดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะดีเอ็นเอที่มี mol% G+C ต่ำ จะมีความเสถียร (stable) น้อยกว่า ทำให้โครงสร้างดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ส่งผลให้แรงจับระหว่างดีเอ็นเอกับ TEAA มีน้อยกว่า สายดีเอ็นเอที่มี mol% G+C สูง เป็นผลทำให้ดีเอ็นเอสายที่มี mol% G+C น้อยกว่าถูกชะออกมาก่อน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสายของดีเอ็นเอที่มาจากต่างสายพันธุ์กันโดยวิธี DHPLC คือ ปริมาณของ acetonitrile ในระบบและอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่สนใจ (Sivakumaran *et al.*, 2003) ข้อดีของเทคนิค DHPLC นั้น เป็นวิธีที่ง่าย ไม่มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก และใช้ระยะเวลาสั้นในการวิเคราะห์ กล่าวคือ เมื่อเปิดเครื่อง DHPLC และรอให้เครื่องพร้อมทำงาน (equilibrate) ไม่เกิน 30 นาที ก็สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สนใจได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากได้ในคราวเดียวกัน และสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่เราสนใจออกจากชิ้นดีเอ็นเออื่น โดยอาศัย fragment collector ซึ่งเป็นเครื่องคัดแยก



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

สายดีเอ็นเอที่สนใจออกมา ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในด้านของการพิสูจน์เพื่อระบุชนิด เพื่อนำดีเอ็นเอที่สนใจนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป (Ogier *et al.*, 2004)



บทที่ 3

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. การวางแผนพื้นที่ การเก็บตัวอย่าง และการแยกยีสต์จากดินตัวอย่างโดย culture-dependent method และการศึกษาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์บางประการ

กำหนดแปลงพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างจากป่าเบญจพรรณ และป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยกำหนดชนิดป่าละ 1 แปลง ทั้งนี้จะพิจารณาจากชนิดพันธุ์ของไม้ในระดับเรือนยอด และพื้นล่างของป่าไม้เป็นหลัก ร่วมกับสภาพทางภูมิประเทศ สภาพภูมิอากาศ ปัจจัยทางกายภาพ เคมี และชีวภาพอื่นๆ การวางแผนพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างไม่กระทบกระเทือนหรือทำให้พื้นที่ป่าอนุรักษ์เสียหาย ดินตัวอย่างที่ได้มารวมกันเป็น 12 composite samples เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ต่อไป

การแยกยีสต์จากดินตัวอย่างทำตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kurtzman and Sugiyama (2001) โดยใช้ดินตัวอย่างในอาหาร acidified yeast extract malt extract broth ที่มีสารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดโพรพิโอนิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเป็น 3.7 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-7 วัน จากนั้นทำการแยกยีสต์ที่เจริญในอาหารดังกล่าว โดยใช้ acidified yeast extract malt extract agar ที่มีสารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดโพรพิโอนิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเป็น 3.7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-7 วัน เมื่อพบโคโลนิบนผิวหน้าอาหาร ทำการเลือกเก็บโคโลนีที่มีความแตกต่างกัน และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค cross streak บนอาหาร yeast extract malt extract (YM) agar และเก็บยีสต์บริสุทธิ์ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป การศึกษาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์บางประการ เช่น cell shapes, colony morphology การทำปฏิกิริยากับสี Diazonium Blue B และการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูริเอส ตามวิธีมาตรฐาน (Kurtzman and Fell, 1998; Barnett *et al.*, 2000)

2. การพิสูจน์เพื่อระบุชื่อยีสต์ตามหลักการ Phylogenetic identification

การสกัดแยกดีเอ็นเอจากเซลล์ยีสต์ 45 สายพันธุ์ตามวิธีการของ Kurtzman and Robnett, 1998; Sumpradit, 2005) เพื่อใช้เป็น DNA templates เตรียม D1/D2 domain ของ 26S ribosomal DNA sequences ตามวิธีของ Kurtzman and Robnett (1998) และทำการตรวจสอบ amplicon ที่ได้โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis ร่วมกับการย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นทำการแยก amplicon ให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick Purification Kit (Qiagen) และนำ amplicon ที่ได้มาทำ cycle-sequencing โดยใช้ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystems) ร่วมกับการใช้เทคนิค PCR ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำเอาผลการทดลองมาวิเคราะห์หาลำดับเบสของ D1/D2 domain ของ LSU rDNA (26S rDNA) และนำไปใช้ในการระบุชื่อสปีชีส์ของยีสต์โดยการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ D1/D2 domain ใน database ของ DDBJ (DNA Data Bank of Japan) โดยใช้โปรแกรม BLAST บน homepage ดังกล่าว พร้อมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม CLUSTAL X 1.61



3. การวิเคราะห์ความหลากหลายของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้งโดยใช้เทคนิค Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

แยกดีเอ็นเอจากดินตัวอย่างโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Xia *et al.* (2006) สารละลายดีเอ็นเอที่แยกได้ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DNA Purification kit วิเคราะห์ DNA yield โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร วิเคราะห์ความบริสุทธิ์โดยการหาค่า OD₂₆₀/OD₂₃₀

การเพิ่มปริมาณของยีนที่ครอบคลุมบริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit ribosomal DNA (LSU rDNA) โดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับคู่ primer ที่เหมาะสมทำการขยายปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเทคนิค PCR ที่ใช้ forward primer ITS1FD (5'-GGTCATTTAGWGGAATAA-3') และ reverse primer LR6 (5'-CGCCAGTTCTGCTTACC-3') (Gadanho and Sampaio, 2004) โดย PCR condition ที่ใช้คือ เริ่มจากการทำ predenaturation ที่ 94 °C นาน 5 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 94 °C นาน 1 นาที annealing ที่ 56 °C นาน 1 นาที และ extension ที่ 72 °C นาน 90 วินาที จำนวนทั้งหมด 35 รอบ ตามด้วย final extension ที่ 72 °C นาน 5 นาที จากนั้นตรวจสอบ PCR products โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis ร่วมกับการใช้ DNA size marker เพื่อเป็นการยืนยันว่า PCR products ที่ได้เป็นยีนเป้าหมาย จากนั้นทำการแยก PCR products จากองค์ประกอบอื่นๆในการทำ PCR โดยใช้ QIAquick Purification Kit (Qiagen) PCR products ที่ได้จากนำมาเพิ่มปริมาณโดยใช้เทคนิค PCR ตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Cocolin *et al.* (2002) และ Gadanho and Sampaio (2004) ซึ่งใช้ GC-clamp forward primer NL1 (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCCATATCAATAAGC-3') และ reverse primer LS2 (5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3') และใช้ LS2-F (5'-GAGTCGAGTTGTTTGGGAAT-3') และ GC-clamp primer NL4 (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') และนำ GC-clamp amplicons ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Denaturing High-Performance Liquid Chromatography ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Barlaan *et al.* (2005) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 domain ของ LSU rDNA ที่ตรวจพบจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DHPLC ดำเนินการโดย manual fraction collection จากนั้นนำมาทำ cycle-sequencing โดยใช้ BigDye™ Terminator V3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied, Biosystems) ร่วมกับการใช้เทคนิค PCR ซึ่งใช้ forward primer NL1 และ reverse primer NL4 ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต โดย PCR condition ที่ใช้การทำบริสุทธิ์ cycle-sequencing product ที่ได้ และการพิสูจน์เพื่อระบุชนิดของยีสต์ทำตามวิธีข้างต้นที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้



บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การวางแผนพื้นที่ การเก็บดินตัวอย่าง และการแยกยีสต์จากดินตัวอย่างโดย culture-dependent method และการศึกษาคุณสมบัติทางฟีโนไทป์บางประการ

ดินตัวอย่างจากป่าเบญจพรรณ และป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ชนิดป่าละ 12 ตัวอย่าง ซึ่งเป็น composite samples ได้กำหนดรหัสดินตัวอย่างเป็น MDF-MW 01-12 และ DEF-MW 01-12 ตัวอย่างดินที่ได้นำมาวิเคราะห์ค่าพีเอชพบว่า ดินตัวอย่างทั้งหมดมีค่าความเป็นกรดแตกต่างกันไป โดยดินป่าเบญจพรรณมีค่าความเป็นกรดในช่วง 4.2-5.6 และดินป่าดิบแล้งมีค่าความเป็นกรดในช่วง 4.0-5.8

จากการคัดแยกยีสต์จากดินตัวอย่างสามารถคัดแยกยีสต์ได้จากดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้งจำนวน 16 และ 29 สายพันธุ์ ตามลำดับ ยีสต์ทั้งหมดเก็บเป็น working stock ในอาหาร YM agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ long-term preservation stock ในอาหาร YM broth ที่เติมกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปพิสูจน์เพื่อจัดจำแนกยีสต์โดยใช้ phylogenetic identification รวมทั้งศึกษา phenotypic characteristics ต่อไป

นำยีสต์จำนวน 45 สายพันธุ์มาทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่สำคัญเพื่อระบุว่าเป็นยีสต์กลุ่มแอสโคไมยซีส (ascomycetous yeasts) หรือยีสต์กลุ่มเบสิดิโอไมยซีส (basidiomycetous yeasts) โดยทดสอบการทำปฏิกิริยากับสี Diazonium Blue B และการทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส พบว่า ยีสต์ทั้งหมดทุกสายพันธุ์ให้ผลการทดสอบใน 2 การทดสอบเป็นลบ (negative results) แสดงว่า ยีสต์ทั้ง 45 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในการศึกษานี้เป็น ascomycetous yeasts เนื่องจาก ascomycetous yeasts ขาดความสามารถในการทำปฏิกิริยากับสี Diazonium Blue B และขาดความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (Kurtzman and Fell, 1998; Barnett, 2000) และจากการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์พบว่า ยีสต์ทุกสายพันธุ์มีลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่หลากหลาย เช่น กลม (round) รูปไข่ (ovoid) และรี (ellipsoid) เป็นต้น สีของโคโลนีคือ ขาว และครีม เป็นต้น

2. การพิสูจน์เพื่อระบุชื่อยีสต์ตามหลักการ Phylogenetic identification

จากการพิสูจน์เพื่อระบุชื่อยีสต์ทั้ง 45 สายพันธุ์ ตามหลักการ phylogenetic identification โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ LSU rDNA พบความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณและป่าดิบแล้ง โดยจัดอยู่ในสกุล คือ *Candida*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Kazachstania*, *Kloeckera*, *Millerozyma*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Tetrapisispora* และ *Yarrowia* (ตารางที่ 1 และ 2)



ตารางที่ 1 ผลการพิสูจน์เพื่อระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกจากดินป่าเบญจพรรณ

รหัสสายพันธุ์	ชนิดของยีสต์ที่ระบุ	% Sequence similarities
MWM57-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
MWM57-2	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	100
MWM57-3	<i>Candida diversa</i>	100
MWM57-4	<i>Kloeckera apiculata</i>	100
MWM57-5	<i>Candida maltosa</i>	100
MWM57-6	<i>Candida albicans</i>	100
MWM57-7	<i>Tetrapisispora namnaonesis</i>	100
MWM57-8	<i>Millerozyma phetchabunensis</i>	99
MWM57-9	<i>Galactomyces geotrichum</i>	100
MWM57-10	<i>Tetrapisispora phaffii</i>	100
MWM57-11	<i>Candida diversa</i>	100
MWM57-12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
MWM57-13	<i>Candida diversa</i>	100
MWM57-14	<i>Candida albicans</i>	100
MWM57-15	<i>Pichia kluyveri</i>	100
MWM57-16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100



ตารางที่ 2 ผลการพิสูจน์เพื่อระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกจากดินป่าดิบแล้ง

รหัสสายพันธุ์	ชนิดของยีสต์ที่ระบุ	% Sequence similarities
DEM57-1	<i>Tetrapisispora phaffii</i>	100
DEM57-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
DEM57-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
DEM57-4	<i>Candida albicans</i>	100
DEM57-5	<i>Candida diversa</i>	100
DEM57-6	<i>Pichia kluyveri</i>	100
DEM57-7	<i>Kloeckera lindneri</i>	100
DEM57-8	<i>Yarrowia lipolytica</i>	99
DEM57-9	<i>Geotrichum candidum</i>	100
DEM57-10	<i>Galactomyces geotrichum</i>	100
DEM57-11	<i>Tetrapisispora namnaonensis</i>	100
DEM57-12	<i>Kloeckera lindneri</i>	100
DEM57-13	<i>Candida albicans</i>	100
DEM57-14	<i>Tetrapisispora namnaonensis</i>	100
DEM57-15	<i>Tetrapisispora phaffii</i>	100
DEM57-16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
DEM57-17	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100
DEM57-18	<i>Debaryomyces hansenii</i>	100
DEM57-19	<i>Yarrowia lipolytica</i>	99
DEM57-20	<i>Kazachstania humatica</i>	99
DEM57-21	<i>Geotrichum candidum</i>	100
DEM57-22	<i>Tetrapisispora phaffii</i>	100
DEM57-23	<i>Tetrapisispora namnaonensis</i>	100
DEM57-24	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
DEM57-25	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	100
DEM57-26	<i>Candida albicans</i>	100
DEM57-27	<i>Kazachstania humatica</i>	99
DEM57-28	<i>Tetrapisispora namnaonensis</i>	100
DEM57-29	<i>Geotrichum candidum</i>	100



3. การวิเคราะห์ความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้งโดยใช้เทคนิค Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

ผลการศึกษาในขั้นตอนนี้ไม่ประสบผลสำเร็จ คาดว่าเป็นผลโดยตรงจากการสกัดแยกกรดนิวคลีอิกของยีสต์จากดินตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บจากป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรังของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งมีการปนเปื้อนของปริมาณกรดอินทรีย์ โดยเฉพาะกรดฮิวมิกในปริมาณสูง พิจารณาจากความเข้มของ supernatants ที่ได้จากการสกัดมีสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งมีผลกระทบต่อปริมาณกรดนิวคลีอิกของยีสต์ที่สกัดแยกได้ ส่งผลต่อ negative results ในขั้นตอนของ PCR amplification

จากการประเมินบทบาทเชิงนิเวศวิทยาของยีสต์ที่พบในดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้ง ของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ พบว่า ยีสต์ที่พบกระจายตัวในดินป่าธรรมชาติทั้ง 2 ชนิด มีบทบาทสำคัญในเชิงนิเวศของระบบนิเวศป่าไม้ ดังนี้ 1) การย่อยสลายอินทรีย์สารผ่านกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน/ไม่ใช้ออกซิเจนและการหมัก เช่น *Candida albicans*, *C. diversa*, *C. maltosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Galactomyces geotrichum*, *Geotrichum candidum*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania humatica*, *Kloeckera apiculata*, *K. lindneri*, *Millerozyma phetchabunensis*, *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus*, *Tetrapisispora namnaonensis*, *T. phaffii* และ *Yarrowia lipolytica* 2) การช่วยละลายหินฟอสเฟต เช่น *Ga. geotrichum* และ *Ge. candidum* 3) บทบาทในวัฏจักรคาร์บอน วัฏจักรไนโตรเจน วัฏจักรออกซิเจน วัฏจักรไฮโดรเจน วัฏจักรฟอสฟอรัสและวัฏจักรซิลิเคต เช่น *C. albicans*, *C. diversa*, *C. maltosa*, *D. hansenii*, *Ga. geotrichum*, *Ge. candidum*, *H. uvarum*, *Ka. humatica*, *K. apiculata*, *K. lindneri*, *M. phetchabunensis*, *P. kluyveri*, *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *T. namnaonensis*, *T. phaffii* และ *Y. lipolytica* 4) การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและการป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช เช่น *C. albicans*, *C. diversa*, *C. maltosa*, *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* และ *Y. lipolytica* 5) การสร้างสารปรับสภาพโครงสร้างดิน เช่น *C. albicans* และ 6) การเป็นอาหารให้แก่สิ่งมีชีวิตอื่นที่เป็นผู้ล่า เช่น *Tetrapisispora namnaonensis* และ *T. phaffii*



บทที่ 5

อภิปรายและวิจารณ์ผล

ป่าธรรมชาติในพื้นที่อนุรักษ์ของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยเฉพาะป่าเบญจพรรณและป่าดิบแล้ง เป็นส่วนหนึ่งของผืนป่าตะวันตกของประเทศไทยที่มีความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศป่าไม้ ที่ได้รับการคาดหมายว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ทั้งในแง่ของความหลากหลายชนิด ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความหลากหลายของแหล่งอาศัย ทั้งนี้ดินได้รับการคัดเลือกให้เป็นตัวอย่างที่นำมาศึกษาวิจัยเพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางชีวภาพโดยเฉพาะความหลากหลายของยีสต์ซึ่งเป็นเชื้อราเซลล์เดียวที่คาดว่าจะมีความหลากหลายชนิดในระดับสูง จากการคัดแยกยีสต์จากดินตัวอย่างที่เก็บจากป่าเบญจพรรณและป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์พบว่า ยีสต์ที่พบมีจำนวนทั้งหมด 17 ชนิดหรือสปีชีส์ ประกอบด้วย *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *C. diversa*, *K. apiculata*, *C. maltosa*, *C. albicans*, *T. namnaonensis*, *M. phetchabunensis*, *Ga. geotrichum*, *P. kluyveri*, *K. lindneri*, *T. phaffii*, *G. candidum*, *Y. lipolytica*, *D. hansenii*, *H. uvarum* และ *Ka. humatica* ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับความหลากหลายชนิดของยีสต์ที่พบในดินป่าไม้ในพื้นที่กลุ่มป่าแก่งกระจานพบว่ามีความหลากหลายชนิดของยีสต์น้อยกว่า โดยยีสต์ที่พบในดินกลุ่มป่าแก่งกระจาน คือ พบยีสต์ 28 ชนิด คือ *Asterotremella humicola*, *Blastobotrys mokoensis*, *Candida albicans*, *C. boidinii*, *C. californica*, *C. cylindracea*, *C. diversa*, *C. fukuyamaensis*, *C. maltosa*, *C. pseudolambica*, *C. zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *D. nepalensis*, *D. polymorphus*, *Geotrichum fragans*, *Ge. silvicola*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania humatica*, *Kloeckera lindneri*, *Millerozyma phetchabunensis*, *Pichia galeiformis*, *P. kluyveri*, *P. spartinae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kluyveri*, *S. unisporus*, *Tetrapisispora namnaonensis* และ *Yarrowia lipolytica* รวมทั้งยีสต์ชนิดใหม่ 1 ชนิด คือ *Candida kaengkachanensis* sp. nov. ซึ่งการระบุชนิดของยีสต์ใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน D1/D2 domain ของ 26S rDNA ของยีสต์ที่แยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้กับยีนบริเวณเดียวกันของยีสต์ทุกชนิดที่พบในแหล่งอาศัยต่างๆบนโลก ที่ปรากฏในฐานข้อมูลของ DNA Data Bank of Japan (DDBJ) โดยหากยีนของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบกันมีความเหมือนกันมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป แสดงว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นยีสต์ชนิดเดียวกัน หากยีนของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบกันมีความเหมือนกันน้อยกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ หรือมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์แสดงว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นยีสต์ต่างชนิดกัน (Kurtzman and Robnett, 1998) ความหลากหลายชนิดของยีสต์ที่พบต่างกัันนั้นอาจเป็นผลจากหลายปัจจัยทั้งด้านกายภาพ และชีวภาพ เช่น ความอุดมสมบูรณ์/ชนิดและคุณสมบัติของดินตัวอย่าง ความผันแปรของปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพในระบบนิเวศป่าไม้ในเขตพื้นที่ของอุทยานแห่งชาติและกลุ่มป่า ตลอดจนปัจจัยเกี่ยวพันทางกายภาพและชีวภาพอื่นๆ เช่น สภาพภูมิอากาศ แหล่งน้ำ แหล่งอาหาร การกระจายพันธุ์ของพืชละสัตว์ในพื้นที่ เป็นต้น ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าไม้ในต่างประเทศที่ปรากฏในอดีตมีความแตกต่างจากที่พบในประเทศไทย ดังนี้ Slavikova and Vadkertiova (2000) ศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ที่อาศัยอยู่ในดินของป่าผลัดใบ (deciduous forest) และป่าสน (coniferous forest) ในประเทศสโลวาเกีย พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในดินของป่าทั้งสองชนิด ส่วนใหญ่เป็นยีสต์ในกลุ่ม basidiomycetous yeasts คือ *Cryptococcus laurentii*, *C. albidus*, *C. macerans*, *C. terreus*,



Cystofilobasidium capitatum, *Leucosporidium scottii*, *Rhodotorula aurantiaca*, *R. glutinis*, *R. rubra*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Trichosporon cutaneum* และ *T. pullulans* สำหรับยีสต์ส่วนน้อยที่พบเป็นยีสต์ในกลุ่ม ascomycetous yeasts คือ *Candida famata*, *Debaryomyces castellii*, *D. polymorphus*, *Kloeckera apis* และ *Pichia americana* ในปีต่อมา Polyakova et al. (2001) ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์ในดินที่มีความชื้นสูงที่เก็บในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ในเขต Western Siberia และ Hummocky Tundra Region ที่ Cape Borrow (Alaska) พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในดินเป็นยีสต์ในกลุ่ม basidiomycetous yeasts เช่นเดียวกัน โดยชนิดที่พบบ่อย คือ *Cryptococcus albidus*, *C. gilvescens* และ *Rhodotorula mucilaginosa* สำหรับยีสต์ในกลุ่ม ascomycetous yeasts ที่พบ คือ *Candida paludigena* และ *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าของอุทยานแห่งชาติในประเทศออสเตรเลียที่พบว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในดินเป็นยีสต์กลุ่ม basidiomycetous yeasts โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Cryptococcus* หลายชนิด (Wuczkowski and Prillinger, 2004) ทั้งนี้ผลการคัดแยกที่ได้ ascomycetous yeasts หรือ basidiomycetous yeasts ขึ้นกับสภาวะที่ใช้ในการคัดแยกยีสต์ เช่น ชนิดของอาหาร อุณหภูมิที่ใช้ และระยะเวลาในการบ่ม cultivation/isolating plates เป็นต้น

ในการศึกษารังนี้โดยใช้ culture-independent approach เพิ่มเติม โดยสกัดดีเอ็นเอของยีสต์จากดินตัวอย่าง ก่อนนำไปเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายที่ใช้เป็น phylogenetic markers เพื่อใช้พิสูจน์เพื่อระบุชนิดของยีสต์โดยใช้การเปรียบเทียบ DHPLC profiles ของ culturable strains ที่ปรากฏในรายงานวิจัยฉบับนี้ ยังมีอุปสรรคในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอของยีสต์จากดินตัวอย่างที่เป็นผลขัดขวางจากปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินตัวอย่าง โดยเฉพาะกรดฮิวมิกและอนุพันธ์ของกรดฮิวมิก ที่มีมากอันเนื่องมาจากความอุดมสมบูรณ์ของดินที่ปรากฏผ่านปริมาณอินทรีย์วัตถุในดินที่สัมพันธ์กับกรดฮิวมิกและอนุพันธ์ของกรดฮิวมิก



บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ความหลากหลายชนิดของยีสต์ในดินป่าเบญจพรรณ และดินป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ พบว่า ยีสต์ 16 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินป่าเบญจพรรณ เป็นยีสต์ที่มีความแตกต่างกัน 11 ชนิด คือ *Candida albicans*, *C. diversa*, *C. maltosa*, *Galactomyces geotrichum*, *Kloeckera apiculata*, *Millerozyma phetchabunensis*, *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus*, *Tetrapisispora namnaonensis* และ *T. phaffii* และยีสต์ 29 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินป่าเบญจพรรณ เป็นยีสต์ที่มีความแตกต่างกัน 13 ชนิด คือ *C. albicans*, *C. diversa*, *Debaryomyces hansenii*, *G. geotrichum*, *Geotrichum candidum*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania humatica*, *Kloeckera lindneri*, *P. kluyveri*, *S. cerevisiae*, *T. namnaonensis*, *T. phaffii* และ *Yarrowia lipolytica* ทั้งนี้ยีสต์ดังกล่าวมีบทบาทเชิงนิเวศในระบบนิเวศป่าไม้ คือ การย่อยสลายอินทรีย์สารผ่านกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน/ไม่ใช้ออกซิเจนและการหมัก การช่วยละลายหินฟอสเฟต บทบาทในวัฏจักรคาร์บอน วัฏจักรไนโตรเจน วัฏจักรออกซิเจน วัฏจักรไฮโดรเจน วัฏจักรฟอสฟอรัสและวัฏจักรซัลเฟอร์ การส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช การป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช การสร้างสารปรับสภาพโครงสร้างดิน และการเป็นอาหารให้แก่สิ่งมีชีวิตอื่นที่เป็นผู้ล่า



บทที่ 7

บรรณานุกรม

- Bai, F.Y., Takashima, M., Jia, J.H. and Nakase, T. 2002. *Dioszegia zsoitii* sp. nov., a new ballistoconidium-forming yeast species with two varieties. **Journal of General and Applied Microbiology**. 48: 17-23.
- Barlaan, E.A., Sugimori, M., Furukawa, S. and Takeuchi, K. 2005. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography. **Journal of Microbiological Methods**. 61: 399-412.
- Bridge, E. and Spooner, B. 2001. Soil fungi: diversity and detection. **Plant Soil** 232: 147-154.
- Cocolin, L., Daniele, A., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G. 2001. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast population in raw milk. **International Dairy Journal**. 12: 407-411.
- Cocolin, L., Bission, L.F. and Mills, D.A. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**. 189: 81-87.
- do Carmo-Sousa, L. 1978. Taxonomy and systematics of yeasts, pp. 5-78. In A.H. Rose and J.S. Harrison, eds. **The Yeasts Volume1: Biology of Yeasts**. Academic Press, New York.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. and Statzell-Tallman, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 50: 1351-1371.
- Felske, A., Rheims, H., Wolterink, A., Stackebrandt, E. and Akkermans, A.D.L. 1997. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. **Microbiology**. 143: 983-989.
- Fonseca, A., Fell, J.W., Kurtzman, C.P. and Spencer-Martins, I. 2000. *Candida tartarivorans* sp. nov., an anamorphic ascomycetous yeast with the capacity to degrade L(+)- and meso-tartaric acid. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 50: 389-394.
- Gadanhó, M. and Sampaio, J.P. 2004. Application of temperature gradient gel electrophoresis to the study of yeast diversity in the estuary of the Tagus river, Portugal. **FEMS Yeast Research**. 5: 253-261.
- Goto, S., Iwasaki, H., Okuma, Y., Ito, Y. and Endo, A. 1987. New species belonging to the genera *Pichia* and *Candida*. **Journal of General and Applied Microbiology**. 33: 275-286.
- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G. and Bailey, M.J. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal



- DNA-and rRNA-based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**. 66: 5488-5491.
- Hirai, A., Kano, R., Makimura, K., Duarte, E.R., Hamdan, J.S., Lachance, M.A., Yamaguchi, A. and Hasegawa, A. 2004. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 54: 623-627.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**. 16: 111-120.
- Kurtzman, C.P. 2001. Four new *Candida* species from geographically diverse locations. **Antonie van Leeuwenhoek**. 79: 353-361.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large subunit (26S) ribosomal DNA gene. **Journal of Clinical Microbiology**. 35: 1216-1233.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**. 73: 331-371.
- Kurtzman, C.P. and J. Sugiyama. 2001. Ascomycetous yeasts and yeastlike taxa, pp. 179-200. In D.J. McLaughlin and P.A. Lemke, eds. **The Mycota VII: Systematics and Evolution Part A**. Springer-Verlag, Berlin.
- Lachance, M.A. 1990. Yeast selection in nature, pp. 21-41. In C.J. Panchal, ed. **Yeast Strain Selection**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Lachance, M.A., Bowles, J.M., Starmer, W.T. and Barker, S.F. 1999. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. **Canadian Journal of Microbiology**. 45: 172-177.
- Limtong, S., Srisuk, N., Yongmanitchai, W., Kawasaki, H., Yurimoto, H., Nakase, T. and Kato, N. 2004. Three new thermotolerant methylotrophic yeasts, *Candida krabiensis* sp. nov., *Candida sithepensis* sp. nov., and *Pichia siamensis* sp. nov., isolated in Thailand. **Journal of General and Applied Microbiology**. 50: 119-127.
- Loung, D.T., Takashima, M., Ty, P.V., Dung, N.L. and Nakase, T. 2000. Four new species of *Kockovaella* isolated from plant leaves collected in Vietnam. **Journal of General and Applied Microbiology**. 46: 279-310.
- Ma, W.K., Siciliano, S.D. and Germida, J.J. 2005. A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. **Soil Biology Biochemistry** 37: 1589-1597.
- McCormack, P.J., Wildman, H.G. and Jeffries, P. 1994. Production of antibacterial compounds



- by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi. **Applied and Environmental Microbiology.** 60: 927-931.
- Middelhoven, W.J. 1997. Identity and biodegradative abilities of yeasts isolated from plants growing in an arid climate. **Antonie van Leeuwenhoek.** 72: 81-89.
- Middelhoven, W.J., Scorzetti, G. and Fell, J.W. 2001. *Trichosporon porosum* comb. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast inhabiting soil, related to the *loubieri/laibachii* group of species that assimilate hemicelluloses and phenolic compounds. **FEMS Yeast Research.** 1: 15-22.
- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology.** 2: 317-322.
- Muyzer, G. and Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek.** 73: 127-141.
- Muyzer, G., de Waal, E.S. and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology.** 59: 695-700.
- Nakase, T. 2000. Expanding world of ballistosporus yeasts: distribution in the phyllosphere, systematics and phylogeny. **Journal of General and Applied Microbiology.** 46: 189-216.
- O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives, pp. 225-233. In D.R. Reynolds and J.W. Taylor, eds. **The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiosis and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics.** CAB International, Wallingford.
- Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H. and Heard, G.M. 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research.** 4: 865-877.
- Reith, F., Drake, H.L. and Kusel, K. 2002. Anaerobic activities of bacteria and fungi in moderately acidic conifer and deciduous leaf litter. **FEMS Microbiology Ecology.** 41: 27-35.
- Scorzetti, G., Petrescu, I., Yarrow, D. and Fell, J.W. 2000. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. **Antonie van Leeuwenhoek.** 77: 153-157.
- Shin, K.S., Shin, Y.K., Yoon, J.H. and Park, Y.H. 2001. *Candida thermophila* sp. nov., a novel thermophilic yeast isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 51, 2167-2170.



- Journal of Basic Microbiology.** 40: 207-212.
- Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. 1997. **Yeasts in Natural and Artificial Habitats.** Springer-Verlag, Berlin.
- Sumpradit, T. 2005. Yeast diversity in soils from hill evergreen, mixed deciduous, dry dipterocarp, and pine forests in Nam Nao National Park. **Ph.D. thesis**, Kasetsart University.
- Thanh, V.N., Hai, D.A. and Lachance, M.A. 2003. *Issatchenkia hanoiensis*, a new yeast species isolated from frass of the litchi fruit borer *Conopomorpha cramerella* Snellen. **FEMS Yeast Research.** 4: 113-117.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research.** 22: 4673-4680.
- van der Walt, J.P., Nakase, T., Suzuki, M., Takashima, M. and Yamada, Y.. 1994. *Debaryomyces polymorphus* var. *africanus*, a new variety of ascosporogenous yeast found in South Africa. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 40: 331-337.
- van Dijken, J.P. and W. Harder. 1974. Optimal conditions for the enrichment and isolation of methanol-assimilating yeasts. **Journal of General and Applied Microbiology.** 84: 409-411.
- Wuczkowski, M. and Prillinger, H. 2004. Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen"). **Microbiological Research.** 159: 263-275.
- Yarrow, D. 1998. Methods for isolation, maintenance, and identification of yeasts, pp. 77-100. In C.P. Kurtzman and J.W. Fell, eds. **The Yeasts: A Taxonomic Study.** 4th ed. Elsevier Science, Inc., Amsterdam.