



วิทยานิพนธ์

การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากอินทรีย์วัตถุที่ได้จากป่าชายเลนโดย
อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

IDENTIFICATION OF YEAST ISOLATED FROM ORGANIC
MATTERS IN MANGROVE FORESTS BY CONVENTIONAL
AND MOLECULAR TAXONOMY

นางสาวกุสุมาวดี ประสาทศรี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2549

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากอินทรีย์วัตถุที่ได้จากป่าชายเลนโดยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและ
อนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

Identification of Yeast Isolated from Organic Matters in Mangrove Forests by
Conventional and Molecular Taxonomy

โดย

นางสาวกุสุมาวดี ประสาทศรี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-2878-1

กุสุมาวดี ประสาทศรี 2549: การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากอินทรีย์วัตถุที่ได้จากป่าชายเลนโดย
อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
(จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
รองศาสตราจารย์สาวตรี ลิ้มทอง, Dr. Eng. 152 หน้า
ISBN 974-16-2878-1

การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างกิ่งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วง ที่เก็บจากป่า
ชายเลนจังหวัดตราดและจันทบุรี ภาคตะวันออกของประเทศไทย และจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์
ชุมพร และสุราษฎร์ธานี ภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 70 ไอโซเลต โดยใช้อนุกรมวิธานระดับ
โมเลกุลซึ่งอาศัยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA พบว่า 53 ไอโซเลต
เป็นยีสต์สปีชีส์ที่มีรายงานแล้ว เนื่องจากการแทนที่นิวคลีโอไทด์เพียง 0-2 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/
D2 ของ 26S rDNA ซึ่งยีสต์เหล่านี้อยู่ใน Phylum Ascomycota, Class Hemiascomycetes, Order
Saccharomycetales โดยมี 30 ไอโซเลตที่อยู่ใน Family Saccharomycetaceae และจัดจำแนกเป็น 5 สกุล
9 สปีชีส์ และมี 23 ไอโซเลตที่อยู่ใน Family Candidaceae โดยจัดจำแนกเป็น 2 สกุล 11 สปีชีส์ ยีสต์ที่
จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่เนื่องจาก นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA มีการแทนที่มากกว่า
1 เบสเพอร์เซ็นต์ มีจำนวน 12 ไอโซเลต และในการศึกษาค้นคว้านี้ได้เสนอเป็นสปีชีส์ใหม่โดยอาศัย polyphasic
taxonomy ซึ่งประกอบด้วยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม อนุกรมวิธานเคมี อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการ
หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และการวิเคราะห์ไฟโลจีนีพร้อมทั้งทำการตั้ง
ชื่อจำนวน 12 สปีชีส์ คือ *Candida bangsaphanensis* sp. nov., *Candida chanthaburiensis* sp. nov.,
Candida kungkrabaenensis sp. nov., *Candida langsuanensis* sp. nov., *Candida phetchaburiensis* sp.
nov., *Candida rayongensis* sp. nov., *Candida surathaniensis* sp. nov., *Candida tratensis* sp. nov.,
Debaryomyces chumphonensis sp. nov., *Debaryomyces siamensis* sp. nov., *Kluyveromyces siamensis*
sp. nov. และ *Pichia prachuapensis* sp. nov. นอกจากนี้ยังมียีสต์ที่ไม่สามารถจัดจำแนกถึงระดับสปีชีส์ได้
ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม จำนวน 5 ไอโซเลต คือ *Candida* sp. EM 53, *Candida* sp. EM 96, *Candida*
sp. SM 25, *Debaryomyces* sp. EM 2 และ *Debaryomyces* sp. EM 64

จากผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากอินทรีย์วัตถุในป่าชายเลนพบว่าสปีชีส์ที่มีรายงานแล้วที่พบ
ส่วนใหญ่ คือ *Issatchenkia orientalis* (7 ไอโซเลต) และสปีชีส์ใหม่ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Candida* โดย
จากการศึกษาในครั้งนี้พบยีสต์ที่เป็นสปีชีส์ใหม่ 17.1 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ทั้งหมดที่นำมาจัดจำแนก

Kusumawadee Prasatsri 2006: Identification of Yeast Isolated from Organic Matters in Mangrove Forests by Conventional and Molecular Taxonomy. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology.
Thesis Advisor: Associate Professor Savitree Limtong, Dr.Eng. 152 pages.
ISBN 974-16-2878-1

Seventy yeast isolates obtained from decayed plant parts (branches, leaves, barks and fruits) which were collected from mangrove forests in eastern provinces (Trat and Chanthaburi) and southern provinces (Petchaburi, Prachuap Khiri Khan, Chumphon and Surat Thani) of Thailand were identified on the basis of analysis of D1/D2 domain of 26S rDNA sequences similarity. Fifty-three isolates were identified as to known species in Phylum Ascomycota, Class Hemiascomycetes, Order Saccharomycetales because their D1/D2 domain sequences difference by only 0-2 nucleotide substitutions from their closest species. Thirty isolates represented 9 species of 5 genera in Family Saccharomycetaceae while 23 isolates were identified as 11 species of 2 genera in Family Candidaceae. The other 12 isolates were assigned as novel species based on the different in sequences of D1/D2 domain of 26S rDNA that greater than 1% nucleotide substitutions. In this study 12 novel species were purposed by using polyphasic taxonomy including conventional taxonomy, chemotaxonomic study, molecular taxonomy based on sequencing of D1/D2 domain of 26S rDNA and phylogenetic analysis. They were *Candida bangsaphanensis* sp. nov., *Candida chanthaburiensis* sp. nov., *Candida kungkrabaenensis* sp. nov., *Candida langsuanensis* sp. nov., *Candida phetchaburiensis* sp. nov., *Candida rayongensis* sp. nov., *Candida surathaniensis* sp. nov., *Candida tratensis* sp. nov., *Debaryomyces chumphonensis* sp. nov., *Debaryomyces siamensis* sp. nov., *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. and *Pichia prachuapensis* sp. nov. Five isolates could not be identified to species level, including *Candida* sp. EM 53, *Candida* sp. EM 96, *Candida* sp. SM 25, *Debaryomyces* sp. EM 2 and *Debaryomyces* sp. EM 64, and more study is needed.

The predominant described species found in this study was *Issatchenkia orientalis* (7 isolates). On the other hand most of the novel species were belonged to the genus *Candida*. The result of this study revealed that 17.1% of the total isolates represented novel species.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. ศาวิตรี ลิ้มทอง ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณา
ตรวจแก้ไข ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา และให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์อย่างยิ่ง
ตลอดจนปลูกฝังให้รักที่จะศึกษาการจัดจำแนกยีสต์อย่างแท้จริง ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วิเชียร
ขงมานิตชัย กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา ให้ความอนุเคราะห์ใน
การใช้เครื่องมือต่างๆ รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ
รศ. ดร. สุนันทา รัตนโก กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ ที่กรุณาให้ข้อคิด คำแนะนำ และตรวจ
แก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. อรินทิพย์
ธรรมชัยพินิต ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณยายที่เลี้ยงดูหล่อหลอมให้เป็นคนที่รักการศึกษา
ฝึกให้เป็นคนที่อดทนต่ออุปสรรคต่างๆ และเป็นกำลังใจที่สำคัญของข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ ครู และอาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้แก่
ข้าพเจ้าจนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ พี่ เพื่อน และน้องๆ ภาควิชาชีววิทยาทุกคนที่ให้คำแนะนำ และให้
ความช่วยเหลือต่างๆ เป็นอย่างดี

กุสุมาวดี ประสาทศรี

พฤศจิกายน 2549

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	39
ผลและวิจารณ์ผล	54
สรุป	134
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	136
ภาคผนวก	145

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจำแนกประเภทของแอสโคไมซีต์สปีส์	8
2	การจำแนกประเภทของแบล็ดิโอมัยซีต์สปีส์	9
3	สารประกอบคาร์บอนที่ใช้ในการทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้ สารประกอบคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน	14
4	ความสามารถในการอนุกรมวิธานแต่ละระดับของยีนตำแหน่งต่างๆ ใน rDNAs	20
5	สายพันธุ์ยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างกิ่งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ ร่วง ที่เก็บจากป่าชายเลนจังหวัดตราด และจันทบุรี ภาคตะวันออกของ ประเทศไทย	39
6	สายพันธุ์ยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างใบไม้ร่วงที่เก็บจากป่าชายเลนจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี ภาคใต้ของประเทศไทย	42
7	การจัดจำแนกยีสต์ที่เป็นสปีชีส์ที่มีรายงานแล้วที่แยกจากตัวอย่างกิ่งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วง ที่เก็บจากป่าชายเลนจังหวัดตราด และ จันทบุรี ภาคตะวันออกของประเทศไทย	56
8	การจัดจำแนกยีสต์ที่เป็นสปีชีส์ที่มีรายงานแล้วที่แยกจากตัวอย่างใบไม้ร่วง ที่เก็บจากป่าชายเลนจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และ สุราษฎร์ธานี ภาคใต้ของประเทศไทย	60
9	การจัดจำแนกยีสต์ที่เป็นสปีชีส์ใหม่จากตัวอย่างพืชที่แยกจากป่าชายเลน ภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย	64
10	การจัดจำแนกยีสต์ที่อาจเป็นสปีชีส์ใหม่ หรือสปีชีส์ที่มีรายงานแล้ว จาก ตัวอย่างพืชที่แยกจากป่าชายเลน ภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศไทย	66

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ตำแหน่งของยีนต่างๆ ใน rDNA	19
2	หลักการของพีซีอาร์	24
3	การแยกโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส	25
4	ต้นไม้วิวัฒนาการของยีสต์รหัส EM 2, 57, 64 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	68
5	ลักษณะวิทยาของ <i>Debaryomyces siamensis</i> sp. nov.	71
6	ต้นไม้วิวัฒนาการของยีสต์สายพันธุ์ EM 9 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	74
7	ลักษณะวิทยาของ <i>Candida tratensis</i> sp. nov.	77
8	ต้นไม้วิวัฒนาการของยีสต์สายพันธุ์ EM 33 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	79
9	ลักษณะวิทยาของ <i>Candida chanthaburiensis</i> sp. nov.	82
10	ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรหัส EM 40 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	84
11	ลักษณะวิทยาของ <i>Candida kungkrabaenensis</i> sp. nov.	87
12	ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรหัส EM 65 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	89
13	ลักษณะวิทยาของ <i>Candida rayongensis</i> sp. nov.	92
14	ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรหัส SM 4 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	92
15	ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรหัส SM 6 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	99
16	ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรหัส SM 16 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	103
17	ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรหัส SM 17 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	105
18	ลักษณะวิทยาของ <i>Kluyveromyces siamensis</i> sp. nov.	108
19	ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรหัส SM 37 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	112
20	ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรหัส SM 40 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	116
21	ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรหัส SM 56 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	120
22	ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรหัส EM 53 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	122
23	ลักษณะวิทยาของ <i>Candida</i> sp. EM 53	125
24	ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรหัส EM 96 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	127
25	ลักษณะวิทยาของ <i>Candida</i> sp. EM 96	130

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรห้ส SM 25 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	131

การจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากอินทรีย์วัตถุที่ได้จากป่าชายเลน โดยอนุกรมวิธานแบบ ดั้งเดิม และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

Identification of Yeast Isolated from Organic Matters in Mangrove Forests by Conventional and Molecular Taxonomy

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีภูมิอากาศแบบร้อนชื้นมีความอุดมสมบูรณ์ และมีความหลากหลายของระบบนิเวศสูง จึงมีผลทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพทั้งของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์มาก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เพื่อให้รู้ถึงชนิดของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นที่มีอยู่ในระบบนิเวศในประเทศไทย ตลอดจนเพื่อการรวบรวมและนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมกันมากพบได้ทั่วไปในแหล่งธรรมชาติ สำหรับประเทศไทยการศึกษาด้านความหลากหลายของยีสต์มีน้อยเมื่อเทียบกับการนำไปใช้ประโยชน์ การศึกษาความหลากหลายของยีสต์อาจทำได้โดยการแยกยีสต์จากแหล่งที่ต้องการศึกษา และนำมาจัดจำแนก (identification) ซึ่งการจัดจำแนกยีสต์อาจทำโดยอาศัยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (conventional taxonomy) และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (molecular taxonomy) หรือใช้อนุกรมวิธานหลายแบบร่วมกัน ที่เรียกว่า polyphasic taxonomy อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมที่ใช้ในการจำแนกประเภท (classification) และการจัดจำแนกยีสต์นั้นอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยา ซึ่งลักษณะดังกล่าวอาจให้ผลการทดลองที่คลุมเครือขึ้นกับสภาวะในการเพาะเลี้ยง (Yamamoto *et al.*, 1991) รวมทั้งให้ผลที่ซับซ้อน ยุ่งยาก และใช้เวลานานในการวิเคราะห์ผล (Arias, 2002) นอกจากนี้จำเป็นจะต้องทดสอบ 50-100 การทดสอบจึงจะมีความน่าเชื่อถือในการนำผลไปใช้ในการจัดจำแนก และในบางการทดสอบจำเป็นจะต้องรอผลนาน 1-4 สัปดาห์ (Barnett *et al.*, 1990; Krejer-Van Rij, 1984; Lin และ Fung, 1987) ซึ่งปัญหาดังกล่าวอาจแก้ไขได้โดยใช้อนุกรมวิธานระดับโมเลกุล สำหรับอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลนั้นเริ่มเมื่อประมาณ 10 ปีที่ผ่านมา ซึ่งในการจัดจำแนกจุลินทรีย์ได้เริ่มมีการใช้ polymerase chain reaction-based โดยเริ่มจากการใช้จัดจำแนกแบคทีเรีย และต่อมามีการปรับปรุงมาใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ โดยเริ่มจากการจัดจำแนกสปีชีส์ยีสต์ด้วยการใช้ restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของ 5.8S rRNA และลำดับเบสของ internal transcribed sequences (ITS)

ทั้งสองด้านคือ ITS1 และ ITS2 ซึ่งเทคนิคนี้ประกอบด้วยการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ (oligonucleotide primers) ที่มีลำดับเบสตรงข้ามกับยีนของ 26S rRNA และ 18S rRNA และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะกับผลผลิตที่ได้จากพีซีอาร์ (PCR product) เนื่องจากในตำแหน่งนี้จะมีทั้งส่วน intraspecific polymorphism ซึ่งเป็นส่วนที่มีวิวัฒนาการช้า และ interspecific polymorphism ซึ่งเป็นส่วนที่มีวิวัฒนาการเร็ว ในปัจจุบันการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับเบส (sequence similarity) และการวิเคราะห์ไฟโลจีนี (phylogenetic analysis) ในโดเมน (domain) D1 และ D2 ซึ่งอยู่ที่ปลายด้าน 5' ของยีนในหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit, LSU หรือ 26S ของไรโบโซม) ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ สามารถให้ผลในการจัดจำแนกสปีชีส์ของยีสต์ได้ถูกต้องและชัดเจน เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็วจึงมีความแตกต่างมากในบรรดาลำดับเบส ซึ่งความแตกต่างในบริเวณนี้พอเพียงที่จะแบ่งแยกสปีชีส์ของยีสต์ได้ โดย Kurtzman และ Robnett (1998) พบว่าจากแอสโคไมซีตส์ยีสต์สปีชีส์ที่มีรายงานแล้วหรือที่รู้จักแล้ว (known species) ประมาณ 500 สปีชีส์ เกือบทั้งหมดสามารถจัดจำแนกได้โดยลำดับเบสของโดเมน D1 และ D2 พร้อมกับเสนอว่ายีสต์ที่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ในโดเมน D1 และ D2 มากกว่า 1 เบอร์เซ็นต์จัดเป็นยีสต์ที่ต่างสปีชีส์กัน และต่อมา Fell *et al.* (2002) พบว่าลำดับเบสในโดเมน D1 และ D2 สามารถใช้สำหรับการจัดจำแนกแบคทีเรียโอมัยซีตส์ยีสต์ได้เช่นกัน

ป่าชายเลนเป็นทรัพยากรธรรมชาติและองค์ประกอบที่สำคัญของระบบนิเวศชายฝั่งทะเลเป็นอย่างยิ่งและเป็นระบบนิเวศที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะแตกต่างไปจากระบบนิเวศอื่น มีองค์ประกอบของพรรณไม้ สัตว์น้ำ และจุลินทรีย์นานาชนิด สามารถทำหน้าที่เป็นตัวปรับสมดุลให้เกิดทั้งระบบนิเวศชายฝั่งและระบบนิเวศบนบก อีกทั้งมีความสำคัญและคุณประโยชน์อย่างมหาศาลต่อความเป็นอยู่ และคุณภาพชีวิตของมนุษย์ เป็นแหล่งเชื้อเพลิงและแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญ ซึ่งสัตว์น้ำชายฝั่งทะเลและสัตว์น้ำทะเลได้อาศัยหาอาหารจากป่าชายเลนเพื่อการเจริญเติบโต และอนุบาลตัวอ่อน นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งรวมความหลากหลายทางชีวภาพไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในป่าชายเลนในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาความหลากหลายของพืช และสัตว์ แต่ยังขาดเรื่องการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ สำหรับการศึกษานี้เป็นการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากอินทรีย์วัตถุในป่าชายเลนทางภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทยโดยอาศัย polyphasic taxonomy ผลจากการจัดจำแนกยีสต์ที่ได้จะสามารถใช้เพื่อรายงานถึงความหลากหลายของยีสต์ในป่าชายเลนในประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์

1. จัดจำแนกยีสต์โดยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (conventional taxonomy)
2. จัดจำแนกยีสต์โดยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (molecular taxonomy) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ที่สร้างขึ้น

การตรวจเอกสาร

อนุกรมวิธานของยีสต์

“ยีสต์” ตามคำดั้งเดิมในหลายภาษามีความหมายสัมพันธ์กับความสามารถในการหมัก เช่น คำในภาษาอังกฤษว่า “yeast” และภาษาดัชท์ “gist” มาจากภาษากรีกว่า “zestos” ซึ่งหมายถึงต้ม เนื่องมาจากลักษณะที่มีฟองปุดขึ้นมาเพราะการสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ คำในภาษาเยอรมัน “hefe” และภาษาฝรั่งเศสว่า “levere” ทั้งสองคำเป็นคำกริยาที่มีความหมายว่าขึ้นฟู ซึ่งเป็นเพราะลักษณะมีฟองปุดขึ้นมาเช่นกัน (สาวิตรี, 2540)

ยีสต์เป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่มีการดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular form) มีรูปร่างหลายแบบ คือ กลม (round) รี (oval) สามเหลี่ยม (triangular) ขาวปลายด้านหนึ่งแหลม (ogival, boat) รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง (apiculated) คนโท (flask) ยาว (elongate) และเป็นสาย (filamentous) ยีสต์บางชนิดมีการสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) และเส้นใยแท้ (true mycelium) วิธีการสืบพันธุ์ของยีสต์มีทั้งการสืบพันธุ์แบบมีเพศและไม่มีเพศ ซึ่งวิธีการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศ ได้แก่ การแตกหน่อ (budding) การแตกหน่อแบบมีฐานกว้าง (bud-fission) การแบ่งเซลล์โดยการขยายขนาดของเซลล์แล้วสร้างผนังกันแบ่งเซลล์ออกเป็นสองส่วน (fission) ยีสต์บางชนิดอาจมีการสร้างคอนิเดีย (conidia) ยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมี 2 พวก คือ แอสโคไมซีตัสยีสต์ (ascomycetous yeasts) และเบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ (basidiomycetous yeasts) ซึ่งสปอร์ทั้งสองชนิดนี้เกิดขึ้นจากการรวมตัวของนิวเคลียส และตามด้วยการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส (meiosis) (สาวิตรี, 2540)

อนุกรมวิธาน (taxonomy) ประกอบด้วยการจำแนกประเภท (classification) การจัดจำแนก (identification) และการตั้งชื่อ (nomenclature) อนุกรมวิธานของยีสต์เริ่มในปี ค.ศ.1838 เมื่อ Mayers ได้กำหนดชื่อสกุล *Saccharomyces* จากคำภาษากรีกว่า sakehar ซึ่งแปลว่าน้ำตาล และ mykes ซึ่งหมายถึงเชื้อรา (fungi) Hansen เป็นคนแรกที่สร้างระบบสำหรับอนุกรมวิธานของยีสต์ โดยในปี ค.ศ.1878 Hansen แสดงให้เห็นว่ายีสต์เป็นราที่การดำรงชีวิตส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยว และได้แยกเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1881 (สาวิตรี, 2549) ปัจจุบันหนังสือที่นิยมใช้เป็นคู่มือในการจำแนกประเภทและจัดจำแนกยีสต์ คือ *The Yeasts, A Taxonomic Study* ซึ่งตีพิมพ์มาแล้วทั้งหมด 4 ฉบับ โดยฉบับที่ 1 พิมพ์เมื่อ ค.ศ. 1952 มี Lodder and Kreger-Van Rij

เป็นบรรณาธิการ โดยได้รวบรวมและสรุปการจำแนกประเภทยีสต์ทั้งที่สร้างแอสโคสปอร์และไม่สร้างแอสโคสปอร์ ซึ่งได้จัดแบ่งยีสต์ออกเป็น 26 สกุล และ 164 สปีชีส์ ต่อมาในปี ค.ศ.1970 Lodder จัดพิมพ์ฉบับที่ 2 แบ่งยีสต์ออกเป็น 39 สกุลและ 349 สปีชีส์ ต่อมามีการตีพิมพ์ฉบับที่ 3 ในปี ค.ศ. 1984 โดยมี Kreger -Van Rij เป็นบรรณาธิการ มีการแบ่งยีสต์ออกเป็น 50 สกุล และ 500 สปีชีส์ และพิมพ์ฉบับที่ 4 ในปี ค.ศ. 1998 มี Kurtzman and Fell เป็นบรรณาธิการ โดยมีคำอธิบายถึงยีสต์ซึ่งเป็นที่ยอมรับ 100 สกุล และมากกว่า 700 สปีชีส์ แบ่งยีสต์ออกเป็น 2 Phylum คือ Phylum Ascomycota และ Phylum Basidiomycota ซึ่งทั้ง 2 phylum มีทั้งที่เป็นสกุลเทลิโอเมอร์ฟิก (teleomorphic genera) และสกุลอะนามอร์ฟิก (anamorphic genera) นอกจากนี้ยังมีหนังสืออีกเล่มหนึ่งที่มีประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกยีสต์ คือ *Yeasts: Characteristics and Identification* ซึ่งมี J. A. Barnett, R. W. Payne and D. Yarrow เป็นบรรณาธิการ ปัจจุบันฉบับที่ใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกยีสต์ คือ *The Yeasts, A Taxonomic Study* ฉบับที่ 4 ที่พิมพ์ในปี ค.ศ. 1998

1. การค้นพบที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการจัดจำแนกยีสต์

การค้นพบที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการจัดจำแนกยีสต์ที่มีการรวบรวมไว้ (สาวิตรี, 2549) มีดังนี้

ค. ศ. 1080 เริ่มรู้จักโครงสร้างของยีสต์ โดย Leeuwenhock เป็นผู้อธิบายโครงสร้างของยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ค. ศ. 1822-1832 Persoon and Fries รายงานว่ายีสต์เป็นเชื้อราชนิดหนึ่ง และ Persoon ให้อยีสต์ว่า *Mycoderma*

ค. ศ. 1825-1839 Schwann, Kutzing and De La Tour ตรวจพบการแตกหน่อของยีสต์ และ Schwann อธิบายเกี่ยวกับสปอร์ของยีสต์

ค. ศ. 1866 Berry แสดงวงจรชีวิตของยีสต์และพบว่ายีสต์เป็น ascomycetes

ค. ศ. 1870 Reess สังเกตแอสโคสปอร์ของยีสต์และการงอกของแอสโคสปอร์

ค. ศ. 1896 Hansen เสนอระบบทางวิทยาศาสตร์สำหรับการจัดจำแนกยีสต์

ค. ศ. 1900- 1901 Hoffmeister, Barker and Guilliemond แสดงว่าการสร้างแอสโคสปอร์เป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ในเวลาใกล้เคียงกัน

ค. ศ. 1920-1928 Guillierman อธิบายวิธีของ Hansen ที่ใช้ในการจำแนกยีสต์

ค. ศ. 1934 Winge and Satave ค้นพบและรายงานการเปลี่ยนระหว่าง haploid phase และ diploid phase ในวงจรชีวิตของยีสต์

ค. ศ. 1931-1953 Stelling-Dekken, Lodder, Diddens and Kreger-Van Rij ทำให้การจัดจำแนกยีสต์มีความเป็นอันหนึ่งอันเดียว และเป็นระบบ

ค. ศ. 1943 Lindegren รายงานเกี่ยวกับ homothallism ใน *Saccharomyces*

ค. ศ. 1951 Wickerham ทำให้การศึกษาลักษณะของยีสต์ก้าวหน้าด้วยเทคนิคใหม่

ค. ศ. 1970 Lodder *et al.* จากนานาชาติได้ช่วยกันแก้ไขให้วิธีการจัดหมวดหมู่ของยีสต์ทันสมัยมากขึ้น โดยพิมพ์หนังสือที่ใช้สำหรับการจัดหมวดหมู่ของยีสต์ชื่อ *The Yeasts, A Taxonomic Study* ครั้งที่ 2

ค. ศ. 1978 Price *et al.* ใช้ DNA-DNA homology สำหรับการจัดแบ่งสปีชีส์

ค. ศ. 1984 Kreger -Van Rij รวบรวมข้อมูลที่ศึกษาโดยนักวิทยาศาสตร์จำนวนมาก ปรับปรุงแก้ไขการจัดหมวดหมู่ของยีสต์ โดยพิมพ์หนังสือ *The Yeasts, A Taxonomic Study* ครั้งที่ 3 ให้ทันสมัยมากขึ้น

ค. ศ. 1998 Kurtzman and Fell ปรับปรุงแก้ไขการจัดหมวดหมู่ของยีสต์ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น โดยพิมพ์หนังสือ *The Yeasts, A Taxonomic Study* ครั้งที่ 4

2. การจำแนกประเภทของยีสต์ (Yeast Classification)

การจำแนกประเภทยีสต์ในปัจจุบันอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี รวมถึงลักษณะของอนุกรมวิธานเคมี และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล ซึ่งสามารถแบ่งยีสต์ออกเป็น 2 Phylum คือ Phylum Ascomycota และ Phylum Basidiomycota (Kurtzman and Fell, 1998) ซึ่งจะได้กล่าวถึงรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.1 Phylum Ascomycota

ยีสต์ใน Phylum นี้พวกที่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะเรียกว่า แอสโคไมยซีตัสยีสต์ มีทั้งสกุลที่พบระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า สกุลอะนามอร์ฟิก (anamorphic genus) และสกุลที่พบระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่เรียกว่า สกุลเทลิโอเมอร์ฟิก (teleomorphic genus) ประกอบด้วย 3 Classes คือ Class Archiascomycetes, Class Euascomycetes และ Class Hemiascomycetes ดังแสดงในตารางที่ 1

2.2 Phylum Basidiomycota

ยีสต์ใน Phylum นี้พวกที่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะเรียกว่า แบสิดิโอไมยซีตัสยีสต์ โดยมีทั้งสกุลที่พบเฉพาะระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและสกุลที่พบระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเช่นเดียวกับแอสโคไมยซีตัสยีสต์ ประกอบด้วย 3 Class คือ Class Hymenomycetes, Class Urediniomycetes และ Class Ustilaginomycetes ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงการจำแนกประเภทของแอสโคไมซีตส์

Class	Order	Family ^b	Genus	Family ^b	Genus
Phylum: Ascomycota				Lipomycetaceae E. K. Novák & Zsolt	
Archiascomycetes					<i>Babjevia</i>
	Schizosaccharomycetales Prillinger, Dörfler, Laaser, Eckerlein & Lehle ex Kurtzman				<i>Dipodascopsis</i>
		Schizosaccharomycetaceae Beijerinck ex Klöcker			<i>Lpomyces</i>
			<i>Schizosaccharomyces</i>		<i>Zygozoma</i>
	Taphrinales Gäumann & C.W. Dodge			Metschnikowiaceae T.Kamienski	
		Taphrinaceae Gäumann			<i>Clavispora</i>
			<i>Taphrina</i>		<i>Metschnikowia</i>
			<i>Lalaria</i>	Saccharomycetaceae G. Winter	
	Protomycetales Luttrell ex D. Hawksworth & O.E. Eriksson				<i>Arxiozyma</i>
		Protomycetaceae Gray			? <i>Citeromyces</i>
			<i>Protomyces</i>		? <i>Cyniclomyces</i>
			? <i>Saitoella</i> (Anamorphic genus)		? <i>Debaryomyces</i>
	Pneumocystidales O.E. Eriksson				? <i>Dekkera</i>
		Pneumocystidaceae			? <i>Issatchenkia</i>
			<i>Pneumocystis</i>		<i>Kluyveromyces</i>
					? <i>Lodderomyces</i>
Euascomycetes					? <i>Pachysolen</i>
			? <i>Endomyces</i> (<i>E. scopularum</i>)		? <i>Pichia</i>
Hemiascomycetes					<i>Saccharomyces</i>
	Saccharomycetales Kudryavtsev (synonym Endomycetales Gäumann)				? <i>Saturnispora</i>
		Ascoideaceae J. Schröter			<i>Torulaspora</i>
			<i>Ascoidea</i>		? <i>Williopsis</i>
		Cephaloascaceae L.R. Batra			<i>Zygosaccharomyces</i>
			<i>Cephaloascus</i>	Sacchromycodaceae Kudryavtsev	
		Dipodascaceae Engler & E. Gilg			? <i>Hanseniaspora</i>
			<i>Dipodascus</i>		? <i>Nadsonia</i>
			<i>Galactomyces</i>		<i>Saccharomycodes</i>
			? <i>Sporopachydermia</i>		? <i>Wickerhamia</i>
			? <i>Stephanoascus</i>	Saccharomycopsidaceae von Arx & van der Walt	
			? <i>Wickerhamiella</i>		? <i>Ambrosiozyma</i>
			? <i>Yarrowia</i>		<i>Saccharomycopsis</i>
			? <i>Zygoascus</i>	Candidaceae Windish ex van der Walt (Anamorphic)	
		Endomycetaceae J. Schröter			<i>Aciculoconidium</i>
			? <i>Endomyces</i> ^{c,d} (<i>E. decipiens</i>)		<i>Arxula</i>
			? <i>Helicogonium</i> ^c		<i>Blastobotrys</i>
			? <i>Myriogonium</i> ^c		<i>Botryozyma</i>
			? <i>Phialoascus</i> ^c		<i>Brettanomyces</i>
			? <i>Trichomonascus</i> ^c		<i>Candida</i>
		Eremotheciaceae Kurtzman			<i>Geotrichum</i>
			<i>Eremothecium</i>		<i>Kloeckera</i>
			? <i>Coccidiascus</i>		<i>Myxozyma</i>
					<i>Schizosaccharomyces</i>
					<i>Sympodiomyces</i>
					<i>Trigonopsis</i>

^a Authority names for genera are given in the individual chapters.

^b A question mark preceding the genus name indicates that family assignment is uncertain.

^c Placement in the class Hemiascomycetes is uncertain.

^d The genus *Endomyces* and the family Endomycetaceae are uncertain, see discussion, this chapter.

ที่มา: Kurtzman and Fell (1998)

ตารางที่ 2 แสดงการจำแนกประเภทของเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์

Class	Order	Family	Genus	Family	Genus
	Archiascomycetes			Saccharomycetaceae	
	Schizosaccharomycetales			<i>Arxiozyma</i>	
	Schizosaccharomycetaceae ^a			<i>Citeromyces</i>	
	<i>Schizosaccharomyces</i> ^a			<i>Cyniclomyces</i>	
	Taphrinales			<i>Debaryomyces</i>	
	Taphrinaceae			<i>Dekkera</i>	
	<i>Taphrina</i>			<i>Issatchenkia</i>	
	<i>Lalaria</i> (anamorph of <i>Taphrina</i>)			<i>Kluyveromyces</i>	
	Protomycetales			<i>Lodderomyces</i>	
	Protomycetaceae			<i>Pachysolen</i>	
	<i>Protomyces</i>			<i>Pichia</i>	
	<i>Saitoella</i>			<i>Saccharomyces</i>	
	Euascomycetes			<i>Saturnispora</i>	
	<i>Endomyces</i> (<i>E. scopularum</i>)			<i>Torulaspora</i>	
	<i>Oosporidium</i>			<i>Williopsis</i>	
	Hemiascomycetes			<i>Zygosaccharomyces</i>	
	Saccharomycetales			Saccharomycopsidaceae	
	Ascoideaceae			<i>Ambrosiozyma</i>	
	<i>Ascoidea</i>			<i>Saccharomycopsis</i>	
	Cephaloascaceae			Candidaceae	
	<i>Caphaloascus</i>			<i>Aciculoconidium</i>	
	Dipodascaceae			<i>Arxula</i>	
	<i>Dipodascus</i>			<i>Blastobotrys</i>	
	<i>Galactomyces</i>			<i>Botryozyma</i>	
	<i>Sporopachydermia</i>			<i>Brettanomyces</i>	
	<i>Stephanoascus</i>			<i>Candida</i>	
	<i>Wickerhamiella</i>			<i>Geotrichum</i>	
	<i>Yarrowia</i>			<i>Kloeckera</i>	
	<i>Zygoascus</i>			<i>Myxozyma</i>	
	Endomycetaceae			<i>Schizoblastosporion</i>	
	<i>Endomyces</i>			<i>Sympodiomyces</i>	
	<i>Helicogonium</i>			<i>Trigonopsis</i>	
	<i>Myriogonium</i>				
	<i>Phialoascus</i>				
	<i>Trichomonascus</i>				
	Eremotheciaceae				
	<i>Eremothecium</i>				
	<i>Coccidiascus</i>				
	Lipomycetaceae				
	<i>Babjevia</i>				
	<i>Dipodascopsis</i>				
	<i>Lipomyces</i>				
	<i>Zygozoma</i>				
	Metschnikowiaceae				
	<i>Clavispora</i>				
	<i>Metschnikowia</i>				
	Saccharomycodaceae				
	<i>Hanseniaspora</i>				
	<i>Nadsonia</i>				
	<i>Saccharomycodes</i>				
	<i>Wickerhamia</i>				

ที่มา: (Kurtzman and Fell, 1998; Barnett *et al.*, 2000; Nakase, 2001)

3. ลักษณะที่ใช้สำหรับการอนุกรมวิธานยีสต์ (Yeast Taxonomy) และการจัดจำแนกยีสต์ (Yeast Identification)

ในปัจจุบันการจัดจำแนกยีสต์ใช้ทั้งลักษณะที่ได้จากการอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (Conventional Taxonomy) และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (Molecular Taxonomy) ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวจะช่วยทำให้สามารถจัดจำแนกยีสต์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

3.1 อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม

อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมอาศัยการศึกษาจากลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ซึ่งมีความสำคัญในการจำแนกประเภทยีสต์ในระดับสปีชีส์และมักใช้ในการจัดจำแนกขั้นต้นเนื่องจากมีข้อมูลมากเพียงพอที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการอ้างอิง แต่ลักษณะดังกล่าวมีข้อเสียคือ อาจให้ผลการทดลองที่คลุมเครือขึ้นกับสภาวะในการเพาะเลี้ยง (Guillamo'n *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังให้ผลการทดลองที่ซับซ้อน ยุ่งยาก และใช้เวลานานในการวิเคราะห์ผล (Arias *et al.*, 2002) รวมทั้งจำเป็นต้องมีการทดสอบประมาณ 50-100 การทดสอบ จึงจะมีความน่าเชื่อถือในการนำไปใช้ในการจัดจำแนกยีสต์และบางการทดสอบจำเป็นต้องรอผล 1-4 สัปดาห์ (Guillamo'n *et al.*, 1998)

ลักษณะที่สำคัญที่ใช้ในการจัดจำแนกประเภทของยีสต์ ตามหลักการของอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม ซึ่งเป็นการศึกษาจากลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ซึ่งรวบรวมโดย Kurtzman and Fell (1998) ประกอบด้วย

3.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ก. การเพิ่มจำนวนของเซลล์แบบไม่อาศัยเพศ

1) การแตกหน่อ การแตกหน่อของยีสต์ อาจแบ่งตามโครงสร้างละเอียดของผนังเซลล์ในระหว่างการแตกหน่อได้แก่ การแตกหน่อแบบโฮโลบลาสติก (holoblastic budding) และการแตกหน่อแบบเอนเทอโรบลาสติก (enteroblastic budding) ซึ่งการแตกหน่อแบบโฮโลบลาสติกผนังเซลล์ของเซลล์แม่ทุกชั้นยังคงอยู่สมบูรณ์ในระหว่างการสร้างหน่อ พบใน

Saccharomycetales และยีสต์ที่มีความสัมพันธ์กับยีสต์กลุ่มนี้ ส่วนการแตกหน่อแบบเอนเทอโรบลาสติคจะเกิดจากการมีรอยขาดบนผนังเซลล์ของเซลล์แม่โดยที่ชั้นในของผนังของเซลล์แม่ยื่นเจริญออกไปเพื่อสร้างชั้นนอกสุดของผนังของหน่อ พบในแบคทีเรียโอมัยซีตัสยีสต์และพวกที่มีความสัมพันธ์กับยีสต์กลุ่มนี้ รวมทั้ง Class Archiascomycetes นอกจากนี้อาจแบ่งการแตกหน่อตามตำแหน่งที่เกิด คือ การแตกหน่อขั้วเดียว (monopolar budding) การแตกหน่อสองขั้ว (bipolar budding) และการแตกหน่อหลายขั้ว (multipolar budding) ซึ่งสามารถแตกหน่อได้ทุกตำแหน่งบนเซลล์แม่

2) การแบ่งเซลล์แบบฟิสชัน (fission) เป็นการเพิ่มจำนวนโดยมีการเพิ่มขนาดของเซลล์ก่อนแล้ว จึงมีผนังกันตามขวางแบ่งเซลล์ออกเป็นสองเซลล์ พบเฉพาะใน *Schizosaccharomyces*

3) การสร้างคอนิเดีย (conidia) การสร้างคอนิเดียแบบต่างๆ สามารถใช้ในการแยกสกุลยีสต์ได้

ข. ลักษณะของเซลล์

1) สัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลวและอาหารแข็ง ยีสต์มีรูปร่างเซลล์หลายแบบ เช่น กลม (round, spherical, spheroidal) ค่อนข้างกลม (subglobose) รูปไข่ (oval, ovoidal) รี (ellipsoidal) ทรงกระบอก (cylindrical) ยาว (elongated) แหลมหัวแหลมท้ายแบบมะนาวฝรั่ง (apiculate) เป็นสาย (filamentous) รีและปลายด้านหนึ่งแหลม (ogival) สามเหลี่ยม (triangular) และคนโทหรือฟลาสก์ (flask) การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์อาจใช้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวหรือบนอาหารแข็งก็ได้

2) การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ การเพิ่มจำนวนของยีสต์โดยการแตกหน่อนั้น เมื่อหน่อที่ได้ยังคงติดอยู่กับเซลล์แม่ทำให้เซลล์ต่อกันเป็นสายที่เรียกว่าเส้นใยเทียม (pseudomycelium หรือ pseudohypha) นอกจากนั้นยีสต์หลายชนิดที่สามารถสร้างเส้นใยแท้ที่มีผนังกันและมีการแตกกิ่งก้านสาขา (true septate branching hyphae) ภายใต้อาหารที่เหมาะสม เส้นใยแท่นี้จะขยายขนาดโดยการเจริญอย่างต่อเนื่องและตามด้วยการสร้างผนังกัน การแยกระหว่างเส้นใยแท้ เส้นใยเทียม และแบบที่อยู่ระหว่างกลางทำได้ค่อนข้างยาก การแบ่งเส้นใยแท้และ

เส้นใยเทียมจากหลักเกณฑ์ของ Wickerham (1951) ที่สาวิตรี (2549) ได้สรุปไว้คือ (1) เส้นใยแท้จะเห็นผนังกันมีลักษณะตรงและสะท้อนแสงชัดเจน ส่วนเส้นใยเทียมไม่มีผนังกันที่เห็นได้ชัดและปลายของเซลล์ในระหว่างเส้นใยมีลักษณะโค้งและไม่สะท้อนแสง (2) เส้นใยแท้เซลล์ที่ตรงปลายเส้นใยยาวกว่าเซลล์ภายในเส้นใย แต่เส้นใยเทียมพบว่าเซลล์ที่ปลายสั้นกว่าหรือเท่ากับเซลล์ที่อยู่ถัดไป (3) เส้นใยแท้ไม่แสดงรอยคอดที่ผนังกันหรือบริเวณที่สร้างผนังกันต่อไป ส่วนเส้นใยเทียมแสดงรอยคอดที่เห็นชัดเจนมาก

3) การสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ ยีสต์สามารถสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศชนิดต่างๆ เช่น เอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งพบเฉพาะในสกุล *Cystofilobasidium*, *Filobasidiella*, *Oosporidium* และ *Leucosporidium* ยีสต์บางชนิดสามารถสร้างคลามัยโดสปอร์ (chlamydospore) ซึ่งเป็นสปอร์ที่มีผนังหนาอาจเกิดที่เซลล์ตรงกลางหรือปลายเส้นใย พบใน *Candida albicans* และสกุล *Metschnikowia*

4) โครงสร้างละเอียด (ultrastructure) ของผนังเซลล์และผนังกันโครงสร้างอย่างละเอียดที่ตรวจโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านของผนังเซลล์แอสโคไมซีตยีสต์ และแบสิดิโอไมซีตยีสต์นั้นแตกต่างกัน เนื่องจากผนังเซลล์ของแอสโคไมซีตยีสต์เป็นผนังแบบสองชั้น (two layer cell wall) ประกอบด้วยผนังชั้นนอกที่มีลักษณะบางทึบแสง และชั้นในที่หนาและโปร่งแสง ส่วนแบสิดิโอไมซีตยีสต์ผนังเซลล์ปรากฏเป็นชั้นบางๆ ซ้อนกันหลายชั้น (multilayer หรือ lamellate cell wall) ชั้นในมีหลายชั้นทั้งที่บางโปร่งแสงและทึบแสง และชั้นนอกค่อนข้างกระจาย

ก. ลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

1) การสร้างแอสโคสปอร์ แอสโคสปอร์มีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลมรี รูปถั่ว (reniform) ทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical with obtuse ends) รูปหมวก (hat) รูปหมวกทหาร (helmet) รูปกระสวยและมีระยางค์ (spindle with appendages) และรูปดาวเสาร์ (Saturn, saturniform) ผิวของแอสโคสปอร์อาจมีลักษณะเรียบ บาง หนา และขรุขระ หรือเป็นรอยหยักที่ผิว (warty) นอกจากนั้นการเรียงตัวของแอสโคสปอร์ในแอสคัส สี ขนาด และจำนวนของแอสโคสปอร์ต่อแอสคัส ซึ่งอาจมีตั้งแต่หนึ่งจนถึงหลายแอสโคสปอร์มีความสำคัญในการจัดจำแนกยีสต์ นอกจากแอสโคสปอร์แล้วแบบของแอสคัสสามารถบอกสกุลของยีสต์ได้ เช่น

แอสคัสของ *Lipomyces* มีลักษณะเหมือนถุงและมีระยางค์ (sac-like appendages) ส่วนแอสคัสของ *Metschnikowia* ยาวและมีรอยแยก

2) การสร้างเบสิดิโอสปอร์ การสร้างเบสิดิโอสปอร์ในเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์มักแยกได้ในระยะที่เซลล์ยีสต์มีโครโมโซมหนึ่งชุดซึ่งเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อมากกว่าระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

3.1.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

ก. การใช้สารประกอบคาร์บอน

1) การหมักคาร์โบไฮเดรต การตรวจความสามารถในการหมัก ทำโดยการตรวจการสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำตาลที่ใช้ในการตรวจความสามารถของยีสต์เป็นประจำ คือ ดี-กลูโคส ดี-กาแลกโตส ซูโครส มอลโทส แลกโทส ราฟฟิโนส และอัลฟา-อัลฟาทรีฮาโลส โดยปกติถ้ายีสต์ชนิดนั้นมีความสามารถในการหมักจะพบว่าหมักกลูโคสได้เสมอ รวมทั้งสามารถหมักฟรุคโทสและแมนโนสได้ด้วย

2) แอสซิมิเลชัน (assimilation) สารประกอบคาร์บอน เป็นการทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้สารประกอบคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญแบบใช้ออกซิเจน เป็นการทดสอบที่ใช้บอกความแตกต่างของสปีชีส์ ปัจจุบันการจำแนกสปีชีส์อธิบายถึงการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน 36 ชนิด ดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงสารประกอบคาร์บอนที่ใช้ในการทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้
สารประกอบคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน

ประเภทของสารประกอบคาร์บอน	ตัวอย่างของสารประกอบคาร์บอน
Hexoses	D-glucose, D-galactose, L-sorbose
Disaccharides	cellobiose, lactose, maltose, melibiose, sucrose, α - α trehalose
Trisaccharides	melezitose, raffinose
Polysaccharides	inulin, soluble starch
Pentoses	D-arabinose, L-arabinose, D-ribose, L-rhamnose, D-xylose
Alcohols	meso-erythritol, galactitol, D-glucitol, glycerol, myo- inositol, D-mannitol, ribitol, ethanol, methanol
Organic acids	citric acid, DL-lactic acid, succinic acid, gluconic acid
Glycosides	α -methyl-D-glucoside, salicin
Other compounds	D-glucosamine hydrochloride, N-acetyl-D-glucosamine hexadecane

ข. แอสซิมิเลชันสารประกอบไนโตรเจน ยีสต์ทุกชนิดใช้แอมโมเนียม
ซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้และสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนอื่นได้อีกด้วย แต่แหล่งไนโตรเจน
ที่ใช้ในการจัดจำแนก คือ ไนเตรต ไนไตรต์ เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์ (ethylamine HCl)
คาดาเวอรินไดไฮโดรคลอไรด์ (cadaverine dihydrochloride) แอล-ไลซีน (L-lysine) อิมิดาโซล
(imidazole) กลูโคซามีน (glucosamine) ครีเอทีนีน (creatinine) และครีเอทีน (creatine)

ค. การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามินและความต้องการวิตามิน ยีสต์
ส่วนใหญ่ต้องการวิตามินสำหรับการเจริญมีเพียงไม่กี่ชนิดที่เจริญได้ในอาหารที่ขาดวิตามิน ใน
บรรดาวิตามินต่างๆ นั้นวิตามินซึ่งเป็นที่ต้องการของยีสต์ คือ ไทเอมีน (thiamine) ไบโอติน
(biotin) ไพริดอกซิน (pyridoxine) นิยซิน (niacin) กรดแพนโททีนิก (pantothenic acid) และ
ไมโอ-อินอซิทอล (myo-inositol)

ง. การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง ยีสต์ที่พบจากแหล่งน้ำตาล ความเข้มข้นสูงหรือเกลือความเข้มข้นสูงมักเป็นพวกที่ทนต่อแรงดันออสโมซิส

จ. การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิอื่นๆ ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophile) ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญในช่วง 20-28 องศาเซลเซียส ดังนั้นการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ จึงเป็นลักษณะหนึ่งที่จะช่วยในการจัดจำแนกยีสต์

ฉ. การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ (amyloid) หรือแป้งภายนอกเซลล์ในยีสต์ที่สร้างแคลซูลพบว่า ภายใตสภาวะที่เหมาะสมจะสร้างสารอะมัยลอยด์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วยสารละลายไอโอดีนจะให้สีน้ำเงินหรือสีน้ำเงินอมเขียว ลักษณะนี้มีประโยชน์สำหรับการระบุสปีชีส์ของยีสต์

ช. การไฮโดรไลซ์ยูเรีย การไฮโดรไลซ์ยูเรียเกิดจากการที่เชื้อมีเอนไซม์ยูเรียเอส (urease) ปกติแอสโคไมซ์ยีสต์จะไม่สามารถไฮโดรไลซ์ยูเรีย ยกเว้น *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica* และ *Lipomyces* ในขณะที่แบคทีเรียโอมัยซีตัสยีสต์ส่วนใหญ่สามารถไฮโดรไลซ์ยูเรียได้

ซ. การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี (diazonium blue B) แบคทีเรียโอมัยซีตัสยีสต์จะสามารถทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบีให้สีแดงเข้ม ส่วนแอสโคไมซ์ยีสต์ยีสต์ไม่ทำปฏิกิริยากับสีชนิดนี้ สำหรับกลไกการทำปฏิกิริยายังไม่สามารถบอกได้

3.2 อนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

วิธีการที่ใช้ในการจำแนกประเภทและจัดจำแนกยีสต์โดยวิธีอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมอาศัยการศึกษาจากลักษณะพื้นฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ซึ่งเป็นการตรวจฟิโนไทป์ของเชื้อเป็นวิธีที่ใช้แรงงานมาก ใช้เวลานาน ไม่แม่นยำ และขาดความสามารถในการแยกที่ชัดเจน (Arias, 2002) รวมทั้งมักให้ผลการจัดจำแนกที่มีข้อผิดพลาดและมีข้อโต้แย้งมาก ซึ่งอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวและข้อขัดข้องโต้แย้งในการจัดจำแนกได้ (Guillamo'n, 1998)

การศึกษานุกรมวิชานระดับโมเลกุลประกอบด้วย การศึกษาระดับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ซึ่งรวมถึงการศึกษาองค์ประกอบของเบสในดีเอ็นเอ (สาคิตรี, 2549) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาด้วยวิธีอื่นๆ เช่น Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), DNA-DNA Hybridization, การวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบเบสในดีเอ็นเอ และ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) แต่ในวิธีการต่างๆ การหาลำดับเบสของกรดนิวคลีอิกเป็นวิธีการที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่าวิธีอื่นเพราะไม่ว่าจะมีความสัมพันธ์กันน้อยหรือมากก็สามารถพิสูจน์ได้ด้วยโมเลกุลหรือบริเวณที่ถูกระบุ (สาคิตรี, 2549) สำหรับรายละเอียดจะได้กล่าวในหัวข้อดังนี้

3.2.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจหาความเหมือน หรือความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction endonuclease) ซึ่งจะตัดที่ตำแหน่งที่มีลำดับเบสจำเพาะกับเอนไซม์นั้นๆ โดยไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลทางพันธุกรรม จากนั้นแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอต่างๆ ที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) และตรวจรูปแบบที่เกิดขึ้นได้ โดยการย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ หรือโดยการทำ southern blot และไฮบริไดเซชันด้วยตัวตรวจจับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากแหล่งต่างกันและมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่งดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อนำมาตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เรียกว่า มีพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) หรือ มีอาร์เอฟแอลพีรูปแบบที่แตกต่างกัน ทำให้เทคนิคนี้สามารถจัดจำแนกจุลินทรีย์ได้ในระดับสปีชีส์ และระดับสายพันธุ์ (strain) หรือ variety (สุรินทร์, 2545)

3.2.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจหาความเหมือนหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอแบบสุ่มด้วยไพรเมอร์ขนาดสั้น ประมาณ 10 เบส เนื่องจากการเพิ่มจำนวนแบบสุ่ม รูปแบบของอาร์เอฟดีที่ได้จึงขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน เช่น annealing temperature จำนวนรอบที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของ *Taq* polymerase เป็นต้น ดังนั้นสภาวะที่เปลี่ยนแปลงไปจึงอาจมีผลต่อรูปแบบของอาร์เอฟดีและความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ของแต่ละห้องปฏิบัติการ (มณี, 2544)

3.2.3 DNA-DNA Hybridization เมื่อดีเอ็นเอสายคู่ได้รับความร้อนจะแยกออกจากกันเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และเมื่ออุณหภูมิค่อย ๆ ลดลง ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นสายคู่สม (complementary strand) จะกลับมาจับกันเป็นดีเอ็นเอสายคู่อีกครั้งที่เรียกว่า ไฮบริไดเซชัน หรือ รีแอสโซซิเอชัน (reassociation) การจับคู่ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะเกิดขึ้นได้ดีมาก หรือน้อยเพียงไร ขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ (% relatedness) ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวสองสาย ดังนั้นถ้านำดีเอ็นเอสายเดี่ยวจากจุลินทรีย์ 2 ชนิด มาตรวจสอบดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันจะสามารถบอกถึงความสัมพันธ์และความแตกต่างกันของจุลินทรีย์ทั้งสองได้ โดยทั่วไปถ้าค่าความสัมพันธ์มีค่า $\geq 70\%$ จะถือว่าจุลินทรีย์ทั้งสองอยู่ในสปีชีส์เดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องพิจารณาร่วมกับลักษณะอื่นด้วย เช่น ความสามารถในการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศและความมีชีวิตของสปอร์เหล่านั้น (มณี, 2544)

3.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบเบสในดีเอ็นเอ สายดีเอ็นเอประกอบด้วยไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) 4 ชนิด คือ อะดีนีน (adenine, A) ไทมีน (thymine, T) กัวนีน (guanine, G) และ ไซโตซีน (cytosine, C) จากการวิเคราะห์ปริมาณ G+C พบว่า จุลินทรีย์ต่างชนิด จะมีปริมาณ G+C แตกต่างกัน สำหรับยีสต์จะมีปริมาณ G+C อยู่ระหว่าง 27-70 mol% โดยยีสต์ในกลุ่มแอสโคไมซีตส์ยีสต์มีปริมาณ G+C อยู่ระหว่าง 27-50 mol% ส่วนยีสต์ในกลุ่มเบสิดิโอมัยซีตส์ยีสต์มีปริมาณ G+C อยู่ระหว่าง 50-70 mol% และยีสต์ในสปีชีส์เดียวกันปริมาณ G+C จะแตกต่างกันไม่เกิน 1-2% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีที่ใช้วิเคราะห์ (มณี, 2544)

3.2.5 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นจึงรวมเอาประโยชน์ของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี และประสิทธิภาพของพีซีอาร์เข้าด้วยกัน การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำได้โดยการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ โดย adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่สั้นๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียว (sticky end ligation) เหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ดังนั้นจึงสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้ได้โดยใช้ปลายเหนียว และจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ต่อไป แบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่หนึ่งๆ เรียกว่า ลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP fingerprint) แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์แต่ละตัวอย่างบ่งบอกถึงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์จำเพาะ จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมาย เรียกว่า เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP

marker) หรือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) (สุรินทร์, 2545)

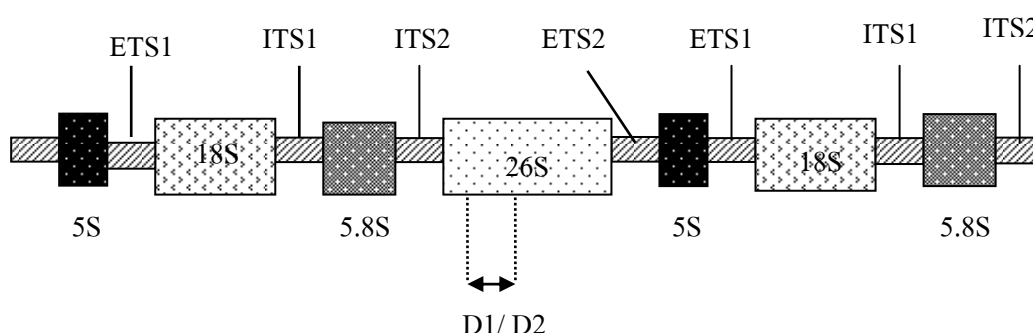
3.2.6 การหาลำดับเบสของกรดนิวคลีอิก สามารถจัดจำแนกยีสต์ได้ถึงแม้จะมีความสัมพันธ์กันน้อยหรือมากก็สามารถพิสูจน์ได้ด้วยโมเลกุลหรือบริเวณที่ถูกวิเคราะห์ และมีจำนวนของข้อมูลจำนวนมาก (สาวิตรี, 2549) ซึ่งสำหรับรายละเอียดของวิธีนี้จะได้กล่าวในหัวข้อต่อไป

3.3 อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลโดยการหาลำดับเบสของกรดนิวคลีอิก (Nucleic acid base sequencing)

การตรวจหาลำดับของเบสในดีเอ็นเอ สามารถใช้แสดงความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการในทุกระดับอนุกรมวิธาน ถ้ายีสต์มีลำดับเบสที่สัมพันธ์กันแสดงว่าเป็นยีสต์ชนิดเดียวกัน

3.3.1 การศึกษาลำดับของเบสในดีเอ็นเอไรโบโซม (Ribosomal DNA)

ไรโบโซม (ribosome) เป็นโครงสร้างอย่างหนึ่งที่จำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของสิ่งมีชีวิต สำหรับยีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มยูคาริโอตจะมีไรโบโซมขนาด 80S ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาดเล็ก (small subunit) มีขนาด 40S ประกอบด้วย 18S rRNA รวมอยู่กับโปรตีน 32 ชนิด และหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) มีขนาด 60S ประกอบด้วย 25-28S rRNA และ 5.8S rRNA รวมอยู่กับโปรตีน 46 ชนิด ซึ่งพบว่า rRNA ทั้ง 3 ชนิด กำหนดการสร้างโดยอาร์ดีเอ็นเอ 3 ชนิด ซึ่งเรียงต่อซ้ำๆ กัน และถอดรหัสเป็น pre-RNA 1 โมเลกุล โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส I (RNA polymerase I, *pol I*) จากนั้นผ่านกระบวนการต่อไปจนได้ mature rDNAs คือ 18S rRNA, 5.8S rRNA และ 25-28S rRNA ซึ่ง rRNAs ทั้ง 3 ชนิด แยกจากกันโดย internal transcribed spacers (ITS) คือ ITS1 และ ITS2 และที่ปลายทั้งสองข้างมี external spacer sequence คือ ETS1 และ ETS2 ในขณะที่ 5S rDNA จะถูกถอดรหัสแยกออกไปเป็นอิสระโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส III (RNA polymerase III, *Pol III*) (สาวิตรี, 2549)



ภาพที่ 1 แสดงตำแหน่งของยีนต่างๆ ใน rDNA

คัดแปลงจาก: <http://www.fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/C7.19.17a.families>.

rDNA (2006)

บริเวณอาร์ดีเอ็นเอจะมีทั้งส่วนของยีนที่มีความผันแปรต่ำ หรือมีลำดับเบสเป็นแบบอนุรักษ์ (conserved sequence หรือ intraspecific polymorphism) ซึ่งเป็นส่วนที่มีวิวัฒนาการช้า และส่วนของ interspecific polymorphism ซึ่งเป็นส่วนที่มีความผันแปรสูง (Kurtzman and Robnett, 1998) โดยบริเวณของยีสต์ที่มีการนำมาหาลำดับเบสประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้

ก. 5S rRNA ในยีสต์มีขนาดเพียง 120 นิวคลีโอไทด์ ทำให้การหาลำดับนิวคลีโอไทด์หรือเบสง่าย เดิมใช้สำหรับการประเมินความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการอย่างกว้างๆ เช่น วิเคราะห์ไฟโลจีนีในระดับอาณาจักร

ข. 18S rRNA เป็นส่วนของหน่วยย่อยขนาดเล็กของไรโบโซมยีสต์ มีขนาด 1,800 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีขนาดใหญ่พอที่จะใช้เพื่อแยกยีสต์ทั้งชนิดที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และชนิดที่มีความสัมพันธ์ห่างกัน เนื่องจากมีบริเวณต่างๆ ที่มีส่วนอนุรักษ์ที่แตกต่างกัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ใน 18S rDNA จะใช้เพื่อแยกความสัมพันธ์ของอนุกรมวิธานในระดับ Order, Class และ Family

ค. 25S-28S rRNA มีขนาดประมาณ 3,200 นิวคลีโอไทด์ มีหลายบริเวณที่ใช้ เช่น บริเวณ 25S-635 (รู้จักในชื่อบริเวณ D2, V3, B หรือ 25S-นิวคลีโอไทด์ 493-622) บริเวณ 25S-1841 (ซึ่งชื่ออื่น คือ 25S- นิวคลีโอไทด์ 1611-1835) และบริเวณ D1/ D2 นอกจากนี้ยังมี

นอกจากนั้นเหตุผลที่ใช้ rDNA/ rRNA ในการอนุกรมวิธาน คือ

- 1) ไรโบโซมปรากฏในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และมีจุดเริ่มต้นของวิวัฒนาการร่วมกัน
- 2) ไรโบโซมมีหลายชุดในแต่ละเซลล์ โดยทุกชุดมีวิวัฒนาการเช่นเดียวกัน
- 3) ลำดับเบสใน rDNA/ rRNA มีทั้งส่วนที่มีวิวัฒนาการน้อยหรือบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และส่วนที่มีวิวัฒนาการมากหรือวิวัฒนาการเร็ว ที่เรียกว่า variable region หรือบริเวณอนุรักษ์น้อย (less conserved region) ทำให้สามารถใช้บริเวณอนุรักษ์เป็นจุดอ้างอิง เพื่อเทียบหาความแตกต่างของบริเวณผันแปรได้

3.3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (polymerase chain reaction) หรือพีซีอาร์ เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะเจาะจงในหลอดทดลอง อาจเรียกได้ว่าเป็น DNA photocopier เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์สซ้ำกันหลายๆ รอบเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ (McPherson and Møller, 2000)

ก. หลักการของพีซีอาร์

พีซีอาร์ประกอบด้วยการทำซ้ำหลายๆ รอบ โดยการสลายพันธะไฮโดรเจนเพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (DNA denaturation) เป็นการทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ โดยการใช้อุณหภูมิสูง 90-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 วินาที ซึ่งดีเอ็นเอสายเดี่ยวนี้อาจใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยตำแหน่งภายในดีเอ็นเอจะต้องเป็นตำแหน่งที่สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างจำเพาะเจาะจง ก่อนการเริ่มพีซีอาร์จำเป็นต้องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 93-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เกิด denaturation อย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นมีการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วที่ 55 องศาเซลเซียส

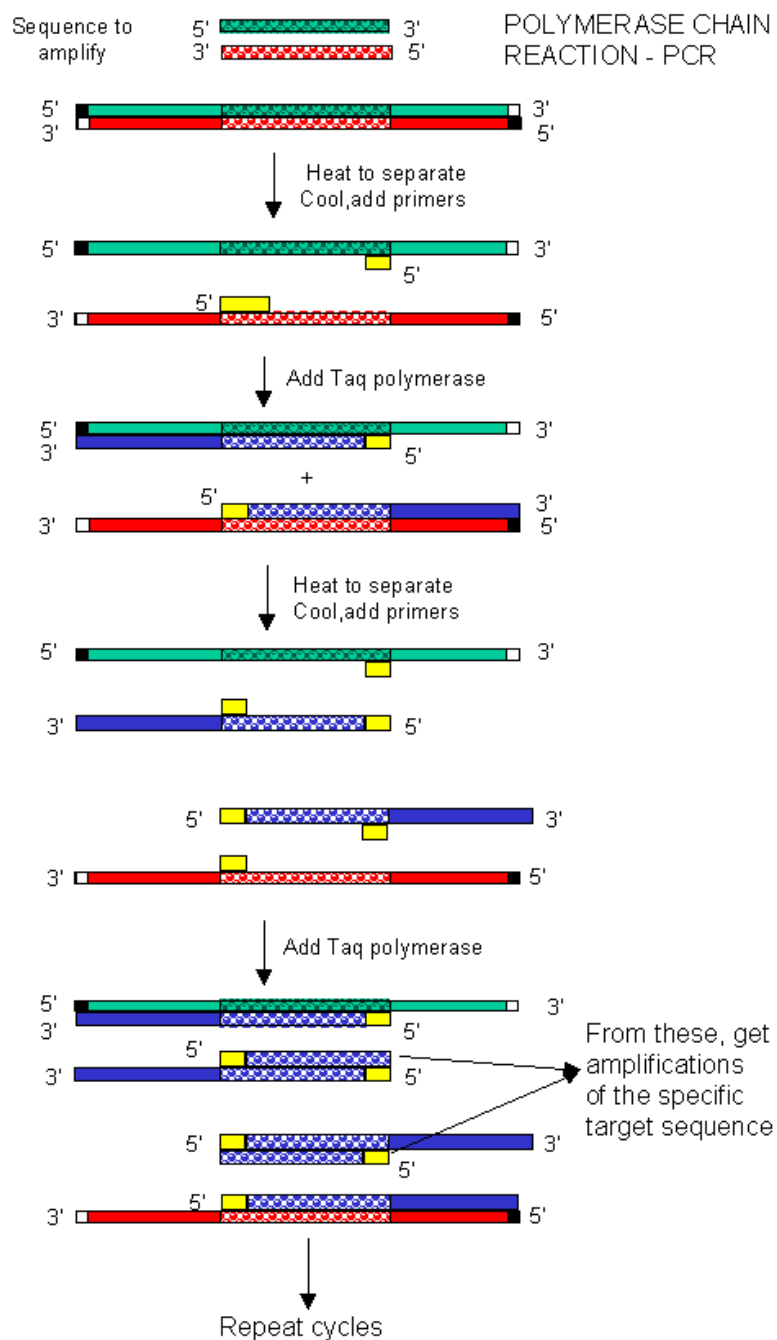
ทันทีเพื่อป้องกันการเกิด misannealing ทำให้เกิดไฮบริดเชนซ์ของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ forward primer และ reverse primer ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอ เป้าหมายและมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่นๆ มากมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ขั้นตอนนี้จะสามารถกำหนดความจำเพาะของพีซีอาร์ได้ โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการ annealing สามารถคำนวณจาก $T_m - 5^{\circ}\text{C}$ (Temperature melting หรือ T_m เป็นอุณหภูมิที่ใช้เพื่อทำให้ดีเอ็นเอ เกลียวคู่แยกเป็นสายเดี่ยว 50 เปอร์เซ็นต์) ถ้าสูงกว่าค่า T_m จะไม่มีโอกาสที่จะไปจับกับดีเอ็นเอ เป้าหมาย มีแต่โอกาสไปแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว แต่ในทางกลับกันจะไปลด ความผิดพลาดของการเติมนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ถูกต้องที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ได้ ในทางตรงกันข้ามถ้าอุณหภูมิต่ำจะทำให้มีโอกาในการเกิดการจับดีเอ็นเอเป้าหมายในตำแหน่งที่ผิดสูงเพราะ ไพรเมอร์จะเข้าจับแบบซำๆ อาจจับในตำแหน่งที่ผิดได้และได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอที่ต้องการ ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของ เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อดีเอ็นเอพอลิเมอเรสพบว่าดีเอ็นเอสายคู่อยู่ (ดีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรเมอร์) แต่ไม่เต็มคู่ก็จะเริ่มสร้างดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ทำให้ได้ดีเอ็นเอ สายใหม่ขึ้นมาอีกหนึ่งเส้น การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จะเริ่มจากทั้งสองของปลาย 3' ของ ไพรเมอร์โดยการเติมนิวคลีโอไทด์จากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' ซึ่งมีการอ่านลำดับเบสบนดีเอ็นเอ เป้าหมายจากปลาย 3' ไปยัง 5' เบสที่ถูกเติมจะเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอเป้าหมายจนกระทั่งได้ดีเอ็นเอ สายใหม่ที่สมบูรณ์

เมื่อสิ้นสุดการทำปฏิกิริยา 1 รอบและถ้าทำปฏิกิริยาต่อในรอบที่ 2 ทั้ง ดีเอ็นเอต้นแบบเดิมและดีเอ็นเอสายใหม่ที่เกิดขึ้นในรอบแรกสามารถที่จะเป็นต้นแบบของการ คัดลอกในรอบต่อไปเป็นลูกโซ่ ซึ่งเป็นที่มาของชื่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และเกิดการเพิ่ม จำนวนเป็นแบบทวีคูณ โดยรอบแรกของพีซีอาร์จะยังไม่ได้ผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์แต่ได้ดีเอ็นเอ สายยาว (ดีเอ็นเอเป้าหมาย) และดีเอ็นเอสายสั้น (ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากไพรเมอร์) และได้ ผลิตภัณฑ์จากพีซีอาร์ที่เป็นเป้าหมายที่ต้องการในพีซีอาร์รอบที่ 3 ตามทฤษฎี ถ้าทำ PCR n รอบ จะได้ดีเอ็นเอเป้าหมายเพิ่มเป็นจำนวน 2^n (รวบรวมจาก McPherson and Møller, 2000; McPherson, Quirke and Taylor, 1991; <http://www.users.ugent.be/~avierstr/principles/seq.html>)

ข. การตรวจสอบและวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากพีซีอาร์

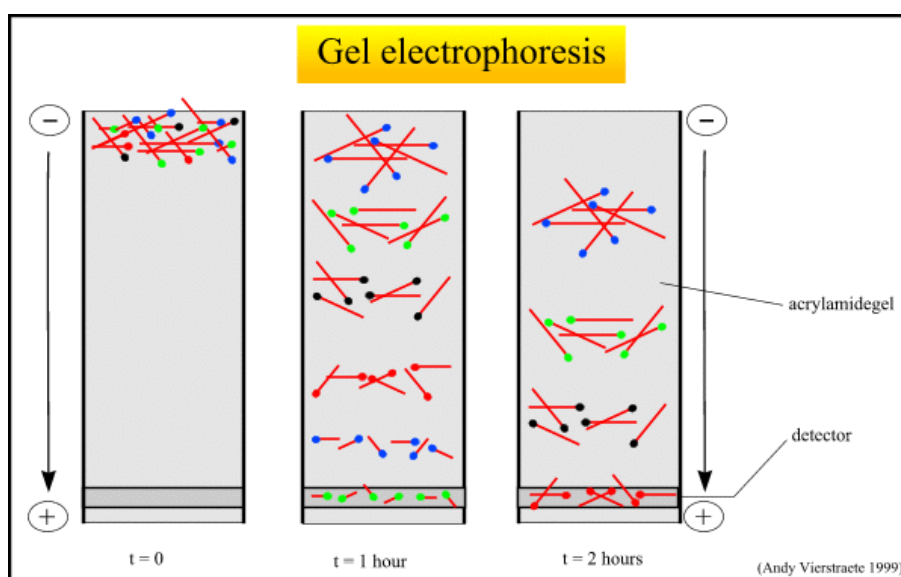
โมเลกุลของดีเอ็นเอคล้ายกับโปรตีนและองค์ประกอบที่เป็นชีวภาพอื่นๆ ที่มีประจุไฟฟ้า ซึ่งดีเอ็นเอมีประจุลบ แสดงว่าเมื่อโมเลกุลของดีเอ็นเออยู่ในสนามที่มีกระแสไฟฟ้า (electric field) จะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วบวก ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า อิเล็กโทรโฟริซิสเจลประกอบ ด้วยโครงสร้างที่เป็นตาข่ายซับซ้อน (complex network) ที่มีลักษณะเป็นรูเล็กๆ โดยชิ้นของดีเอ็นเอ ที่มีขนาดเล็กจะสามารถเคลื่อนที่ผ่านรูเล็กๆ ของเจลได้เร็วกว่า ดังนั้นโมเลกุลของดีเอ็นเอจึงสามารถแยกออกจากกันด้วยความแตกต่างของขนาด องค์ประกอบภายในเจลเป็นอิเล็กโทรโฟริซิส บัฟเฟอร์ ซึ่งเตรียมจาก ionic solution จำเป็นจะต้องเป็นสื่อในการส่งกระแสไฟฟ้าจากขั้วหนึ่ง ไปยังอีกขั้วหนึ่ง (<http://www.users.ugent.be/~avierstr/principles/seq.html>)

ดีเอ็นเอสามารถมองเห็นได้หลังจากย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) หลังการย้อมให้นำไปส่องผ่าน ultraviolet transillumination ทำให้เห็น ดีเอ็นเอเป็นลักษณะแถบ (band)



ภาพที่ 2 แสดงหลักการของพีซีอาร์

Source: [http:// www. employees. csbsju.edu/ hjakubowski/ classes/ SrSemMedEthics/ Human %20Genome%20Project/ DNA1. html](http://www.employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/SrSemMedEthics/Human%20Genome%20Project/DNA1.html) (2002)



ภาพที่ 3 แสดงการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส

Source: [http:// www. users. Ugent. Be/ ~avierstr/ principles/ seq. html](http://www.users.Ugent.Be/~avierstr/principles/seq.html) (2000)

3.3.3 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA Sequencing)

วัตถุประสงค์ คือ การตรวจสอบลำดับของนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยตรวจสอบจากการติดฉลากของฟลูออเรสเซนต์ไว้ที่หัวของดีเอ็นเอซึ่งเคลื่อนที่ภายในเจล ซึ่งโมเลกุลของฟลูออเรสเซนต์จะให้แสงออกเป็นสีที่แตกต่างกันเมื่อลำแสงเลเซอร์ส่องผ่าน โดยแต่ละเบสจะมีสีเฉพาะของตนเอง ดังนั้นจึงสามารถตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่บนดีเอ็นเอได้ แต่ละลำดับเบสของดีเอ็นเอจะมีการยืนยันผลจาก 2 ทิศทางของ forward และ reverse primer เมื่อได้ลำดับเบสของดีเอ็นเอทุกชิ้น โปรแกรมคอมพิวเตอร์จะทำการตรวจสอบความแตกต่างของแต่ละส่วนพร้อมกันและรวบรวมลำดับเบสของดีเอ็นเอทั้งหมด ([http:// www. users. Ugent. Be/ ~avierstr/ principles/ seq. html](http://www.users.Ugent.Be/~avierstr/principles/seq.html))

3.3.4 ต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree)

การสร้างต้นไม้วิวัฒนาการมีจุดมุ่งหมายในการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตตามบรรพบุรุษ ทำให้สามารถตรวจสอบพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิต รวมถึงระยะห่างของวิวัฒนาการ ปัจจุบันเชื่อว่าการจำแนกประเภทที่เชื่อถือได้ต้องอาศัยพื้นฐานของวิวัฒนาการ (phylogeny) และควรพิจารณาความเหมือนหรือความต่างของพันธุกรรมด้วย การหาลำดับเบสในดีเอ็นเอสามารถใช้

แสดงความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการในทุกระดับอนุกรมวิธาน (สาคีรี, 2549)

ความสัมพันธ์ของกลุ่มสิ่งมีชีวิตสามารถแสดงด้วยต้นไม้วิวัฒนาการซึ่งประกอบด้วย nodes และแขนง (branch) โดยแขนงหนึ่งแขนงจะเชื่อม nodes ที่ใกล้เคียงกันสอง nodes เข้าด้วยกัน โดย nodes จะแสดงสิ่งที่ต้องการศึกษา และแขนงแสดงถึงความสัมพันธ์ของสิ่งที่ทำการศึกษาในเชิงบรรพบุรุษและลูกหลาน ลักษณะและรูปแบบของต้นไม้เรียกว่า topology โดยความยาวของแขนงแสดงจำนวนการเปลี่ยนแปลง (หรือแสดงระดับความแตกต่างทางพันธุกรรม) ที่เกิดขึ้นในแขนงนั้น (สุรินทร์, 2545)

4. ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวกับการจัดจำแนกยีสต์โดยใช้นุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและระดับโมเลกุล

ตัวอย่างรายงานใหม่ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการจัดจำแนกยีสต์ โดยใช้นุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและระดับโมเลกุล มีดังต่อไปนี้

Guillamo'n *et al.* (1998) ได้จัดจำแนกยีสต์ 33 สายพันธุ์ที่พบในระหว่างการหมักไวน์โดยการวิเคราะห์อาร์เอฟแอลพี (RFLP) ของ ITS เนื่องจากการจัดจำแนกโดยวิธีการแบบดั้งเดิมได้แก่ การใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีนั้นเพื่อให้เป็นที่ยอมรับต้องศึกษาประมาณ 50-100 การทดสอบ ทำให้ใช้เวลานาน ดังนั้นจึงใช้การจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์อาร์เอฟแอลพีของ ITS เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว พบว่าจะสามารถแยกความแตกต่างของแต่ละสปีชีส์โดยความแตกต่างของแถบ (band) ยกเว้น *Saccharomyces bayanus* ที่ไม่สามารถแยกออกจาก *S. pastorianus* ได้ เนื่องจากมีขนาดและจำนวนของแถบที่เท่ากัน

Kurtzman and Robnett (1998) ศึกษาไฟโลจีนีของยีสต์กลุ่มแอสโคไมซีต 500 สปีชีส์ซึ่งประกอบด้วย *Candida* และ anamorphic genera อื่นๆ โดยอาศัยบริเวณโคเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA และ 18S rDNA จากการวิเคราะห์แสดงว่าลำดับเบสบริเวณ D1 และ D2 ให้ผลการแยกที่ปลายสายวิวัฒนาการดีกว่าลำดับเบสของ 18S rDNA แต่ความสัมพันธ์ของสปีชีส์ให้ผลที่สอดคล้องกันค่อนข้างสูง

Bai *et al.* (1999) แยกยีสต์ที่สร้างบอลลิสโทโคนิเดีย (ballistoconidiogenous yeasts) 16 สายพันธุ์จากใบพืชที่ค่อนข้างแห้ง 5 ชนิด ในมณฑลยูนนาน ประเทศจีน โดยใช้ลักษณะพื้นฐาน วิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี สามารถแบ่งยีสต์ที่แยกได้เป็น 5 กลุ่ม ส่วนการศึกษาลำดับเบสของ 18S rDNA, ITS และ ตำแหน่ง 5.8S rDNA นั้น พบว่ามีความแตกต่างกัน นอกจากนั้น Bai *et al.* (2002) ได้นำ *Sporobolomyces roseus* มาจัดหมวดหมู่ซ้ำ (reclassified) โดยการเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ใน ITS และในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA พบว่า *S. roseus* และ *Sporidiobolus pararoseus* มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกัน นอกจากนี้ยังสามารถจัดจำแนกยีสต์ สปีชีส์ใหม่ คือ *Sporidiobolus phaffii* sp. nov. ซึ่งจากการศึกษาพบว่ายีสต์สปีชีส์ใหม่ที่พบมี ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน ITS ที่คล้ายคลึงกับ *S. roseus* แต่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA จึงสามารถจัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

Arias *et al.* (2002) ได้ศึกษายีสต์ที่อยู่ในน้ำส้มก้น โดยอาศัยความแตกต่างของวิธีการ จำแนกประเภท 5 วิธี คือ ลำดับเบสใน 26S rRNA, restriction pattern analysis ของ 5.8S-ITS, วิธีการแบบดั้งเดิม RapID Yeast Plus System และ API 20C AUX พบว่า ลำดับเบสของ 26S rRNA จะให้ผลที่ถูกต้องและดีที่สุดในการจัดจำแนกเมื่อใช้ร่วมกับวิธีการแบบดั้งเดิม และการ วิเคราะห์ลำดับเบสใน 5.8S-ITS สำหรับ RapID Yeast Plus System และ API 20C AUX จะให้ผลที่ ถูกต้องในการจัดจำแนกเพียง 13-35 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ศึกษาจากลักษณะของรูปแบบหลังการ คัดบริวณ 5.8S-ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถจำแนกสปีชีส์ใหม่ ได้แก่ *Clavispora lusitaniae*, *Geotrichum citri-aurantii*, *Hanseniaspora occidentalis*, *H. vineae*, *Pichia fermentans* และ *Saccharomycopsis crataegensis*

Hall and Watson (2002) รายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Cryptococcus nyarrowii* sp. nov. ซึ่งเป็นเบสิดิโอไมซีตยีสต์ ที่แยกได้ในแอนตาร์กติกา โดยอาศัยลักษณะพื้นฐาน วิทยาและ สรีรวิทยา และการศึกษาลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA พบว่า จากลักษณะทาง พื้นฐาน วิทยาและสรีรวิทยาสามารถจำแนกเป็นสกุล *Cryptococcus* แต่เมื่อใช้ลักษณะสรีรวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์จากการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการจากลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA จึงสามารถจัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

Cadez *et al.* (2003) ได้ศึกษายีสต์ที่มีรูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง (apiculate yeast) คือ *Hanseniaspora-Kloeckera* species โดยการใช้ลักษณะสรีรวิทยา ร่วมกับการใช้อาร์เอพีดี-พีซีอาร์ (RAPD-PCR) การวิเคราะห์ไฟโลจีนีของลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ ITS กับยีนในตำแหน่ง 5.8S rDNA สามารถจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ คือ *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *H. clermontiae* sp. nov., *H. lachahcei* sp. nov. และ *H. opuntiae* sp. nov. ซึ่งผลจากลักษณะสรีรวิทยาสามารถแยก *H. clermontiae* sp. nov. และ *H. lachahcei* sp. nov. ออกจากสปีชีส์อื่นๆ ได้ แต่ไม่สามารถแยก *H. opuntiae* sp. nov. ออกจาก *H. guilliermondii* หรือ *H. meyeri* sp. nov. ออกจาก *H. uvarum* ได้

Daniel and Meyer (2003) ศึกษาการจัดจำแนกยีสต์กลุ่มแอสโคไมยซีตโดยใช้ลำดับเบสของ rDNA และ actin gene และเสนอว่า การศึกษาที่ใช้ในการสร้างพวกโปรตีน เช่น actin gene เป็น marker ในการจัดจำแนกที่เหมาะสมมากกว่าโดเมน D1/D2

Golubev *et al.* (2003) รายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Cryptococcus nemorosus* sp. nov. และ *C. perniciosus* sp. nov. ซึ่งแยกได้จากพืชและดินที่ปลูกหญ้าในประเทศรัสเซีย โดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และใน ITS นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ให้ผลที่สอดคล้องกับ mycocinotyping และการวิเคราะห์ผลระดับโมเลกุล แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันระหว่าง 2 สปีชีส์ใหม่ที่อยู่ในระยะอะนามอร์ฟิกและสปีชีส์ที่อยู่ในระยะเทลิโอโมอร์ฟิก คือ *Papiliotrema bandonii* (Tremellales) ซึ่ง *C. nemorosus* sp. nov. และ *C. perniciosus* sp. nov. สามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้ลักษณะทางชีวเคมีและการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA เท่ากับ 10 นิวคลีโอไทด์

Hong *et al.* (2003) รายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Candida kunwiensis* sp. nov. ซึ่งเป็นระยะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของแอสโคไมยซีตยีสต์ที่แยกได้จากดอกมันฝรั่งในประเทศเกาหลี และ bumble bees ในประเทศเยอรมัน โดยการศึกษาลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุล *Metschnikowia* แต่มีความคล้ายคลึง (similarity) ของลำดับเบสต่ำ โดย *C. kunwiensis* จะมีความคล้ายคลึงของลำดับเบสกับ *M. gruessii* NRRLY-17809 เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ หรือมีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 72 นิวคลีโอไทด์ใน 488 นิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้การใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา พบว่า *C. kunwiensis*

สามารถใช้กรดแลกติก (Lactic acid) ได้ แต่ไม่สามารถสร้าง pulcherrimin จึงสามารถแยกออกจาก *M. pulcherrima* ได้

Jurado *et al.* (2003) รายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Metschnikowia vanudenii* sp. nov. และ *M. lachancei* sp. nov. ที่แยกได้จากดอกไม้และแมลงในประเทศอเมริกาเหนือ โดยวิเคราะห์ลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA สามารถแยกสปีชีส์ใหม่ออกจากสปีชีส์อื่นๆ ในสกุล *Metschnikowia* และพบว่าสปีชีส์ใหม่จะมีความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA) ต่ำเมื่อเทียบกับสปีชีส์อื่นๆ ในสกุลเดียวกัน

Kurtzman (2003a) ศึกษาไฟโลจีใน 18S rDNA, 5.8S rDNA, ITS และ 26S rDNA ของ *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* และสมาชิกของ *Saccharomycetaceae* โดยการใช้ multigene sequence analysis ทำให้สามารถจัดจำแนกยีสต์ได้ใหม่ 5 สกุลได้แก่ *Lachacea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* และ *Zygorulasporea* นอกจากนี้ Kurtzman (2003b) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *Saccharomyces* complex ของ rDNA repeat คือ 18S rDNA, 26S rDNA, ITS, single copy nuclear genes คือ translation elongation factor 1 α และ actin-1, RNA polymerase II และ mitochondria encode genes คือ small subunit rDNA และ cytochrome oxidase II สามารถจัดจำแนกยีสต์ใน *Saccharomyces* complex ที่ศึกษาเป็น *Saccharomyces*, *Arxiozyma*, *Eremothecium*, *Hanseniaspora* (anamorph คือ *Kloeckera*), *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Pachytichospora*, *Saccharomycodes*, *Tetrapisispora*, *Torulaspora* และ *Zygosaccharomyces* ทั้งหมด 75 สปีชีส์ โดยจัดแบ่งออกได้เป็น 14 กลุ่ม

Nakase *et al.* (2003a) รายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Rhodotorula benthica* sp. nov., *R. calyptogenae* sp. nov. และ *R. lysiniphila* sp. nov. ซึ่งแยกได้จากสัตว์น้ำในทะเลลึก โดยการศึกษาลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA, ITS และ 5.8S rDNA นอกจากนี้ Nakase *et al.* (2003b) รายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่อีก 1 สปีชีส์ คือ *Cryptococcus surugaensis* sp. nov. ซึ่งแยกได้จากตะกอนดินในทะเลลึก โดยอาศัยลักษณะพื้นฐานวิทยาร่วมกับการศึกษาลำดับเบสใน 18S rDNA, ITS, 5.8S rDNA และโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสใน rDNA แต่ละตำแหน่งพบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Bullera coprosmaensis* และ *B. oryzae* แต่ไม่พบการสร้างบอริสโคโคนิเดียและการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จึงสามารถแยกออกจาก *B. coprosmaensis* และ *B. oryzae* ได้

Rodrigues and Fonseca (2003) ศึกษาอีสต์กลุ่มแอสโคมัยซีสสกุล *Taphrina* โดยวิธีทางโมเลกุล ได้แก่ PCR fingerprinting โดยใช้ไพรเมอร์เดี่ยวสำหรับ microsatellite การศึกษาลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rRNA และใน ITS ซึ่งรวม 5.8S rDNA พบว่าลำดับเบสใน ITS มีความคงที่ระหว่างสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันสูงกว่าในโดเมน D1/ D2 และลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ก่อนข้างคงที่ภายในสปีชีส์ คือ มีความเหมือนของลำดับเบสมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงใช้ในการแยกความแตกต่างของสปีชีส์ *Taphrina* ได้

Sipiczki (2003) รายงานอีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Candida zemplinina* sp. nov. ซึ่งเป็นออสโมโทริแลนตียีสต์ (Osmotolerant yeast) และอีสต์ทนอุณหภูมิต่ำ (psychrotolerant yeast) ที่แยกได้จากการหมักไวน์ในประเทศฮังการี พบว่า *C. zemplinina* sp. nov. มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *C. stellata* เมื่อศึกษาลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของ *C. zemplinina* sp. nov. พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากถึง 8.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้นิวคลีโอไทด์ใน 5.8S rDNA ของ ITS-5.8S-ITS2 ยังมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากถึง 8 เปอร์เซ็นต์

Takashima et al. (2003) นำ *Cryptococcus laurentii* มาจัดหมวดหมู่ซ้ำ (reclassified) โดยศึกษาลำดับเบสใน 18S rDNA, โดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA และ ITS นอกจากนี้ยังพิจารณาจากผลของลักษณะสรีรวิทยาและชีวเคมีร่วมด้วย สามารถจัดจำแนกเป็นอีสต์สปีชีส์ใหม่ถึง 3 สปีชีส์ คือ *C. aureus* sp. nov., *C. carnescens* sp. nov. และ *C. peneaus* sp. nov.

Teixeira et al. (2003) รายงานอีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Starmerella meliponinorum* sp. nov. ซึ่งเป็นแอสโคมัยซีสที่แยกได้จากผึ้ง โดยการศึกษาลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA และอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม ผลจากการใช้อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าสามารถจัดจำแนกเป็นสกุล *Starmerella* เมื่อวิเคราะห์ไฟโลจีनीในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Candida etchellsii* แต่มีความแตกต่างของลำดับเบสมากถึง 7 เปอร์เซ็นต์ จึงสามารถแยกออกจาก *Candida etchellsii* และจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่

Wang et al. (2003) รายงานอีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Bensingtonia changbaiensis* sp. nov. และ *B. sorbi* sp. nov. ซึ่งเป็นอีสต์ที่สร้างบอริสโทคอนิเดียที่แยกได้จากใบไม้ โดยศึกษาลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA, ITS และ 18S rDNA พบว่าอีสต์สปีชีส์ใหม่ทั้ง 2 สปีชีส์จะมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 จากสกุล *Bensingtonia* เท่ากับ 34

นิวคลีโอไทด์ (5 เปอร์เซ็นต์) และมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ใน ITS-5.8S rDNA จากสกุล *Bensingtonia* เท่ากับ 143 นิวคลีโอไทด์ (ประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์) จึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่

Foschino *et al.* (2004) ใช้อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและวิธีระดับโมเลกุลจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากแป้งหมักใน Italian sweet baked products พบว่าการใช้ลักษณะสรีรวิทยาในการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากแป้งหมักไม่มีความน่าเชื่อถือเพียงพอ ส่วนการใช้อาร์เอพีดี หรือ mitochondrial-DNA restriction enzyme analysis จะเหมาะสมในการจัดจำแนกบางสปีชีส์เท่านั้น เนื่องจากไม่สามารถแยกความแตกต่างของบางไอโซเลตได้ และการวิเคราะห์ลำดับเบสใน ITS เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการจัดจำแนกยีสต์จากแป้งหมัก

Guffogg *et al.* (2004) รายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่คือ *Cryptococcus watticus* sp. nov. ซึ่งเป็นยีสต์ทนเค็มที่แยกได้จากแอนตาร์กติกา โดยศึกษาลำดับเบสของ rDNA และวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

Hirai *et al.* (2004) รายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Malassezia nana* sp. nov. ซึ่งเป็น novel lipid-dependent yeast ที่แยกได้จากสัตว์ในญี่ปุ่นและบราซิล จากต้นไม้วัดนาการที่สร้างจากลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ ITS ซึ่งสามารถจัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่

Inocio *et al.* (2004) ศึกษาคุณสมบัติและจำแนกประเภทของ phylloplane yeast ที่แยกได้ในประเทศโปรตุเกส ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุล *Taphrina* และสามารถจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Lalaria* 5 สปีชีส์ คือ *Lalaria arrabidae* sp. nov., *L. carpini* sp. nov., *L. inositophila* sp. nov., *L. kurtzmanii* sp. nov. และ *L. veronaerambellii* sp. nov. ซึ่งสกุล *Lalaria* เป็นระยะอะนามอร์ฟิกของสกุล *Taphrina* โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา และการศึกษา PCR fingerprinting โดยใช้ไพรเมอร์เดี่ยวสำหรับ microsatellite ลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และใน ITS1 กับ ITS2 และดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA-DNA hybridization)

Thanh *et al.* (2004) รายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Rhodotorula cycloclastica* sp. nov., *R. retinophila* sp. nov. และ *R. terpenoidalis* sp. nov. ซึ่งแยกได้จากดิน โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาร่วมกับการศึกษาลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ

ITS-5.8S rDNA

Wang and Bai (2004) รายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่ในสกุล *Sporobolomyces* ที่แยกได้จากใบไม้ในประเทศจีน โดยเมื่อใช้อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมสามารถจัดจำแนกเป็นสกุล *Sporobolomyces* แต่เมื่อศึกษาลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA และใน ITS สามารถจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ คือ *S. beijingensis* sp. nov., *S. jilinensis* sp. nov., *S. clavatus* sp. nov. และ *S. symmetricus* sp. nov.

Wuczkowski and Prillinger (2004) จัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากดินในประเทศออสเตรเลีย โดยใช้วิธีการระดับโมเลกุล พบว่ายีสต์ทั้งหมด 136 สายพันธุ์ สามารถจัดจำแนกโดยใช้ลำดับเบสใน 26S rDNA เป็น 16 สกุล มีบางสกุลที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจน มี 18 ไอโซเลตจะต้องจัดจำแนกและยืนยันผลโดยใช้ fingerprinting ไอโซเลตที่แยกได้ส่วนใหญ่จะอยู่ในสกุล *Cryptococcus* (61 ไอโซเลต และ 12 sequence types) และเป็นสมาชิกในแบล็คโอไมยซีตัสยีสต์มากกว่าแอสโคไมยซีตัสยีสต์

Coton *et al.* (2005) ศึกษายีสต์ในน้ำแอปเปิ้ลหมักและน้ำมะกอกดำหมัก โดยการตัด ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *cfoI*, *HinfI* และ *HaeIII* พบว่า ในน้ำแอปเปิ้ลหมักพบยีสต์คือ *Candida sake*, *Dekkera anomala*, *Hanseniaspora valbyensis*, *H. uvarum*, *Pichia delftensis*, *Saccharomyces bayanus* และ *S. cerevisiae* จากการศึกษาลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน สำหรับในน้ำมะกอกดำหมักพบยีสต์คือ *P. anomala*, *P. membranifaciens* และ *Debaryomyces hansenii* และจากการศึกษาลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกันเช่นกัน ยกเว้น *D. hansenii* ที่ถูกจัดจำแนกเป็น *D. etchellsii*

Couto *et al.* (2005) นำ 26S rDNA ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *MseI*, *HinfII*, *ApaI*, *BglII*, *BamHI* และ *EcoRI* มาเป็นเครื่องมือในการศึกษายีสต์ในกลุ่ม non-Saccharomyces ที่พบในระหว่างการหมักไวน์แดงและยืนยันผลโดยลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA พบว่า 26S rDNA ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ทำให้ได้ 19 รูปแบบ และมีผลที่สอดคล้องสูงกับผลจากลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ซึ่งสำหรับสายพันธุ์ยีสต์ในกลุ่ม non-Saccharomyces การใช้รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ของ 26S rDNA ก็เพียงพอที่จะใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกยีสต์ที่พบในระหว่างการหมักไวน์แดงในระดับสปีชีส์

Lopandic *et al.* (2005) จัดจำแนกยีสต์ในผลิตภัณฑ์นมโดยใช้วิธีการแบบดั้งเดิมหรือวิธีที่อาศัยฟิโนไทป์ ได้แก่ การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยา และวิธีระดับโมเลกุล หรือการตรวจจีไทป์ (genotypic) ได้แก่ RAPD-PCR และการศึกษาลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA พบว่ายีสต์ส่วนใหญ่ที่พบ คือ *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica* และ *Candida zeylanoides* และจากผลการทดลองพบว่าการจัดจำแนกยีสต์ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมจะให้ผลที่สอดคล้องกับวิธีระดับโมเลกุลเพียง 54 เปอร์เซ็นต์

Maoura *et al.* (2005) จัดจำแนกยีสต์ 76 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมและวิธีระดับโมเลกุล ได้แก่ PCR-RFLP ของ NTS2 rDNA ซึ่งถูกตัดด้วย *AluI* และ *BanI* ลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และการโอไทป์ (karyotyping) โดยใช้ contour clamped homogenous electric field (CHEF) พบว่าวิธีโมเลกุลจะมีความสะดวก รวดเร็ว และสามารถแยก *Saccharomyces cerevisiae* ออกจาก *Kluyveromyces marxianus* ได้ชัดเจนมากกว่าวิธีการแบบดั้งเดิม

Martini *et al.* (2005) รายงานยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Pichia caribbica* sp. nov. ซึ่งเป็นระยะที่มีการสร้างแอสโคสปอร์ของ *Candida fermentati* และ *Candida carpophila* comb. nov. และถูกแยกจาก *C. guilliermondii* var. *carpophila* โดยอาศัยการจัดจำแนกด้วยวิธีแบบดั้งเดิมและวิธีระดับโมเลกุล และสามารถแยก *Pichia caribbica* sp. nov. ออกจาก *P. guilliermondii* โดยพิจารณาจากความเหมือนของดีเอ็นเอซึ่งมีค่าต่ำ ความแตกต่างของ electrophoretic karyotyp และการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA

Molnar *et al.* (2005) ได้ศึกษายีสต์ที่มีความสัมพันธ์กับ *Metschnikowia pulcherrima* และค้นพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *M. andauensis* sp. nov. โดยการศึกษาลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และ actin gene (act-1) ที่มีขนาด 979 คู่เบส พบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 3 สปีชีส์ คือ *M. pulcherrima*, *M. fruticola* และ *M. chrysoperlae* ซึ่งสามารถแยกทั้ง

3 สปีชีส์ออกจากกันโดยการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการของ actin gene และสามารถจัดจำแนกสปีชีส์ใหม่จากความแตกต่างของเบสในโดเมน D1/D2 รวมทั้ง actin gene

5. ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวกับการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้ในประเทศไทย

ตัวอย่างรายงานที่เกี่ยวข้องกับการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้ในประเทศไทย โดยใช้
อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมและระดับโมเลกุล มีดังต่อไปนี้

Takashima and Nakase (1998) รายงานการค้นพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Bullera penniseticola* sp. nov. และ *Kockovaella sacchari* sp. nov. ซึ่งแยกได้จากพืชในประเทศไทย โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี ชนิดของโคเอนไซม์คิว ความสามารถในการสร้างไซโลสในเซลล์ การวิเคราะห์องค์ประกอบเบสในดีเอ็นเอ และการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอ ผลจากลักษณะสัณฐานวิทยา ชีวเคมี สามารถจำแนกเป็นสกุล *Bullera* และ *Kockovaella* ด้วยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม แต่เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอ พบว่าสามารถแยก *Bullera penniseticola* sp. nov. ออกจาก *Bullera hanna*e และ *Bullera huiaensis* ซึ่งมีค่าความเหมือนของดีเอ็นเอเท่ากับ 23 และ 26 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *Kockovaella sacchari* sp. nov. สามารถแยกออกจาก *Kockovaella thailandica* และ *Kockovaella imperatae* ซึ่งมีค่าความเหมือนของดีเอ็นเอเท่ากับ 5-15 เปอร์เซ็นต์ในสกุล *Bullera* และ *Kockovaella* ได้ จึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่

Fungsin *et al.* (2001) ศึกษาอนุกรมวิธานของยีสต์ที่สร้างเบสดีไอโอสปอร์ ซึ่งแยกได้จากพืชในประเทศ โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี อนุกรมวิธานเคมี รวมถึงการวิเคราะห์องค์ประกอบของเบส ความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอ และการหาลำดับเบสของ 18S rDNA สามารถจัดจำแนกเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Bensingtonia thailandica* sp. nov. เนื่องจากเมื่อเทียบกับ *Bensingtonia ciliate*, *B. miscanthi*, *B. phyllada*, *B. subrosea* และ *B. yuccicola* มีค่าความเหมือนของดีเอ็นเอเพียง 5-22 เปอร์เซ็นต์

Fungsin *et al.* (2002) รายงานยีสต์ที่แยกจากใบพืชจากป่าร้อนชื้นในประเทศไทยเป็นแบบสปีชีส์ใหม่คือ *Kockovaella barringtoniae* sp. nov. โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา ชีวเคมี ร่วมกับการศึกษาลำดับเบสของ 18S rDNA และใน ITS นอกจากนั้นสามารถแยกออกจาก *Kockovaella machilophila*, *Kockovaella phaffii* และ *K. shimaie* เนื่องจากมีความเหมือนของดีเอ็นเอเพียง 1-10 เปอร์เซ็นต์

Nagatsuka *et al.* (2002) รายงานยีสต์ทนเค็ม (halotolerant yeast) สปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากปลาหมึกแห้งและถั่วเหลืองหมักในประเทศไทยคือ *Citeromyces siamensis* sp. nov. โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ร่วมกับการวิเคราะห์ไฟโลเจนีจากลำดับเบสใน 18S rDNA และความเหมือนของลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ซึ่งผลจากการศึกษาดังกล่าวแสดงว่า *Citeromyces siamensis* sp. nov. เป็นสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกับ *Citeromyces matritensis* แต่ผลของดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันสามารถบ่งชี้ว่าสายพันธุ์ที่ศึกษาต่างจาก *C. matritensis*

Jindamorakot *et al.* (2004) อธิบายยีสต์ที่แยกจากขุยแมลง (insect frass) ในประเทศไทยซึ่งไม่พบการสร้างแอสโคสปอร์ และพบยีสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่คือ *Candida easanensis* sp. nov., *C. pattaniensis* sp. nov. และ *C. nakhonratchasimensis* sp. nov. โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี ชนิดของโคเอนไซม์คิว องค์ประกอบของเบส G+C และลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA รวมทั้งการวิเคราะห์ไฟโลเจนี ซึ่งการสร้างโคเอนไซม์คิวชนิด Q-7 ให้ผลที่ใกล้เคียงกับสกุล *Pichia* แต่เมื่อวิเคราะห์จากไฟโลเจนีของลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA พบว่า *C. easanensis* sp. nov. สามารถแยกออกจาก *Pichia veronae* และ *P. fabianii* เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1.6 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังต่างจากทั้งสองสปีชีส์เนื่องจากไม่สร้างแอสโคสปอร์ สามารถแอสซิมิเลตราฟิโนส ไม่แอสซิมิเลตแอลอะราบินอส และแอล-แรมโนส ไม่เจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์กับกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งไม่เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ *C. pattaniensis* sp. nov. สามารถแยกออกจาก *P. japonica* เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังไม่สร้างแอสโคสปอร์ และแอสซิมิเลตโซลูเบิลสตาร์ช และแอล-อะราบินอสได้ ส่วน *C. nakhonratchasimensis* sp. nov. สามารถแยกออกจาก *P. americana* และ *P. bimundalis* เนื่องจากมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1.1 และ 1.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังไม่สร้างแอสโคสปอร์ หมักกลูโคสและซูโครสได้เป็นอย่างดี และไม่แอสซิมิเลตราฟิโนส

Limtong *et al.* (2004, 2005) รายงานสปิชีส์ใหม่ของยีสต์ที่ใช้เมทานอลเป็นแหล่งพลังงาน และแหล่งคาร์บอนได้ หรือที่เรียกว่า เมทิลโทโทรฟิกยีสต์ (methylotrophic yeast) ที่แยกได้ใน ประเทศไทย 3 สปิชีส์ คือ *Candida krabiensis* sp. nov., *C. sithepensis* sp. nov., *Pichia siamensis* sp. nov. และ *P. thermomethanolica* sp. nov. โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี อนุกรมวิธานเคมี อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์ไฟโลจีนีจากลำดับเบส ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA

Sumpradit *et al.* (2005) อธิบายยีสต์ที่สร้างแอสโคสปอร์สปิชีส์ใหม่ คือ *Tetrapisispora namnaonensis* sp. nov. ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ร่วมกับการวิเคราะห์ไฟโลจีนีของลำดับเบสของ 18S rDNA และลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA สามารถแยก *T. namnaonensis* sp. nov. ออกจาก *T. arboricola* เนื่องจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA เท่ากับ 6.4 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังสามารถแอสซิมิเลต กรดคี-กลูโคนิก แต่ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์

ยีสต์ที่พบในป่าชายเลน

ป่าชายเลน หรือ ป่าโกงกาง (mangrove forest, intertidal forest) เป็นกลุ่มสังคมพืช ซึ่ง ขึ้นอยู่ในเขตน้ำทะเลลดต่ำสุดและน้ำทะเลขึ้นสูงสุดบริเวณชายฝั่งทะเล มักพบทั่วไปตามพื้นที่ ชายฝั่งทะเล บริเวณปากน้ำ อ่าว ทะเลสาบ ลำคลอง และเกาะที่มีน้ำทะเลท่วมถึง เมื่อกระแสน้ำ ในลำน้ำไหลลงมาปะทะกับกระแสน้ำทะเล หลังจากนั้นน้ำหยุดนิ่งทำให้โคลนเลนและธาตุอาหาร ต่างๆ ซึ่งไหลปะปนมาจมลงเกิดเป็นแผ่นดินโคลนหรือเลน (วันชัย, 2536) ป่าชายเลนเป็น ทรัพยากรธรรมชาติและองค์ประกอบที่สำคัญของระบบนิเวศชายฝั่งทะเลเป็นอย่างยิ่ง เป็นระบบ นิเวศที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะแตกต่างไปจากระบบนิเวศอื่น เนื่องจากป่าประเภทนี้ขึ้นอยู่เฉพาะใน แถบร้อน และอยู่ตามชายฝั่งทะเลระหว่างบริเวณน้ำขึ้นสูงสุดและลดต่ำสุด มีองค์ประกอบของ พรรณไม้ สัตว์น้ำ และจุลินทรีย์นานาชนิด สามารถทำหน้าที่เป็นตัวปรับสมดุลในทั้งระบบนิเวศ ชายฝั่งและระบบนิเวศบนบก อีกทั้งมีความสำคัญและคุณประโยชน์อย่างมหาศาลต่อความเป็นอยู่ และคุณภาพชีวิตของมนุษย์ เป็นแหล่งเชื้อเพลิงและแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญซึ่งสัตว์น้ำชายฝั่ง ทะเลและสัตว์น้ำทะเลได้อาศัยธาตุอาหารจากป่าชายเลนเพื่อการเจริญเติบโตและอนุบาลตัวอ่อน (สนิท, 2541)จากการที่มีน้ำขึ้นน้ำลงตลอดเวลาทำให้เกิดการไหลเวียนของอินทรีย์วัตถุและเกิดการ

ทับถมของตะกอนดิน จึงทำให้ป่าชายเลนมีความอุดมสมบูรณ์สูง นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งรวมความหลากหลายทางชีวภาพ

เนื่องจากป่าชายเลนมีความอุดมสมบูรณ์สูงทำให้เชื่อว่าน่าจะมี ความหลากหลายของ จุลินทรีย์สูง ยีสต์ที่แยกได้จากใบพืชในป่าชายเลนเป็นสิ่งหนึ่งที่ถูกเลือกนำมาศึกษาความหลากหลาย การที่พบยีสต์ในใบพืชเนื่องจากใบพืชเป็นตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์ทำให้มีการผลิตธาตุอาหารต่างๆที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์ โดยยีสต์ที่มักพบบนผิวใบพืชทั้งพืชใบกว้าง และพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมักเป็นเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ ประกอบด้วย *Sporobolomyces* sp. , *Rhodotorula*, *Cryptococcus* และ *Aureobasidium* นอกจากนี้ยังพบสกุล *Candida* บางสปีชีส์ คือ *C. javanicia*, *C. foliarum*, *C. diffuens* และ *C. bogoriensis* (สาวิตรี, 2549)

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการจัดจำแนกยีสต์ที่ได้จากป่าชายเลนได้แก่

Hagler *et. al.* (1993) รายงานยีสต์และแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่างน้ำที่สะสมในแหล่งต่างๆ ในป่าชายเลนของประเทศบราซิล ซึ่งแบคทีเรียและยีสต์ที่พบส่วนใหญ่คือโคลิฟอร์มแบคทีเรีย และเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์รวมทั้งยีสต์ที่มีสีดำที่แยกจากใบพืช

Araujo *et. al.* (1995) พบว่าแอสโคไมซีตัสยีสต์จำนวน 252 ไอโซเลตที่แยกจากเปลือกหอย (mollusk) และปูที่อยู่ในป่าชายเลนในประเทศบราซิล สามารถจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีรายงานแล้ว 40 สปีชีส์ และสปีชีส์ใหม่ 44 สปีชีส์ ซึ่งสปีชีส์ที่มีรายงานแล้วที่พบส่วนใหญ่ได้แก่ *Pichia membranaefaciens*, *Candida valida*-like, *C. krusei*, *C. sorbosa*, *C. colliculosa*-like, *C. famata*-like, *Kloeckera* sp., *C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. silvae*, *Geotrichum* sp., *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus* sp. และเมทิลโดโทรฟิฟิยีสต์ คือ *C. boidinii*

Soares *et. al.* (1997) ศึกษาแอสโคไมซีตัสยีสต์ที่แยกจากโคลนในบริเวณป่าชายเลนทางตอนใต้ของประเทศบราซิล พบยีสต์จำนวน 193 ไอโซเลตซึ่งส่วนใหญ่จัดจำแนกเป็นสกุล *Candida* นอกจากนี้พบว่า *Khuyveromyces aestuarii* เป็นยีสต์ที่สามารถพบอย่างแพร่หลายในป่าชายเลน

การค้นพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Lachancea meyersii* sp. nov. ซึ่งเป็นแอสโคไมซ์ยีสต์ที่แยกได้จากป่าชายเลนในไอส์แลนด์ โดยการศึกษาของ Fell *et. al.* (2004) ได้ศึกษาลักษณะทางชีวเคมี และลำดับเบสในบริเวณ ITS และโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA พบว่าสามารถแยกออกจากสปีชีส์อื่นๆ ในสกุล *Lachancea* เนื่องจากไม่หมักกาแลกโทสแต่หมักมอลโทสได้ นอกจากนี้ยังมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 มากกว่า 1 เบอร์เซ็นต์ จึงสามารถแยกออกจาก *Lachancea thermotolerans* และ *Lachancea waltii*

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สายพันธุ์ที่ใช้

ยีสต์จำนวน 78 ไอโซเลต เป็นยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างกิ้งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วงที่เก็บจากป่าชายเลนในจังหวัดตราด และจันทบุรี ภาคตะวันออกของประเทศไทย และในจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี ภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งเก็บรักษาอยู่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 แสดงสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างกิ้งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วงที่เก็บจากป่าชายเลนจังหวัดตราด และจันทบุรี ภาคตะวันออกของประเทศไทย

หมายเลขเชื้อ	ชื่อตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง
EM 2	เปลือกไม้	บ้านตรอกแซง อ. เมือง จ. ตราด
EM 4	เปลือกไม้ (แสม)	อ. คลองใหญ่ จ. ตราด
EM 6	เปลือกไม้	วัดวรดิษ อ. เมือง จ. ตราด
EM 9	เปลือกไม้	บ้านตรอกแซง อ. เมือง จ. ตราด
EM 14	เปลือกไม้	คลองสะพานหิน อ. เมือง จ. ตราด
EM 17	เปลือกไม้ (ป่าแสม)	อ. คลองใหญ่ จ. ตราด
EM 25	เปลือกไม้ (โปรงแดง)	ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี
EM 33	เปลือกไม้ (โกงกางใบเล็ก)	ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี
EM 38	เปลือกไม้ (แสมทะเล)	ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี
EM 40	กิ้งไม้ร่วง	ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี

ตารางที่ 5 (ต่อ)

หมายเลขเชื้อ	ชื่อตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง
EM 41	เปลือกไม้	ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี
EM 42	เปลือกไม้	ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี
EM 45	ใบไม้ร่วง	ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี
EM 46	ใบไม้ร่วง	ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี
EM 48	ใบไม้ร่วง	แม่น้ำตราด อ. วังกระเจา อ. เมือง จ. ตราด
EM 53	ใบไม้ร่วง	อ. แหลมสิงห์ จ. จันทบุรี
EM 54	ใบไม้ร่วง	อ. แหลมสิงห์ จ. จันทบุรี
EM 57	ใบไม้ร่วง	ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี
EM 63	ใบไม้ร่วง	ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี
EM 64	ใบไม้ร่วง	ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี
EM 65	ใบไม้ร่วง	อ. บ้านเพ จ. ระยอง
EM 67	ใบไม้ร่วง	อ. บ้านเพ จ. ระยอง
EM 69	เปลือกไม้ (แสม)	อ. บ้านเพ จ. ระยอง
EM 70	กิ่งไม้ร่วง, เปลือกไม้	อ. แหลมสิงห์ จ. จันทบุรี
EM 72	ใบไม้ร่วง	บ้านท่าเสา อ. เขาสมิง จ. ตราด
EM 73	ใบไม้ร่วง	คลองสะพานหิน อ. เมือง จ. ตราด
EM 74	ใบไม้ร่วง	คลองสะพานหิน อ. เมือง จ. ตราด
EM 77	ใบไม้ร่วง	คลองสะพานหิน อ. เมือง จ. ตราด
EM 78	ใบไม้ร่วง	คลองสะพานหิน อ. เมือง จ. ตราด

ตารางที่ 5 (ต่อ)

หมายเลขเชื้อ	ชื่อตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง
EM 80	ใบไม้ร่วง	อ. คลองใหญ่ จ. ตราด
EM 82	ใบไม้ร่วง	คลองเนินสูง ต. ท่าพริก อ. เมือง จ. ตราด
EM 85	เปลือกไม้ (แสม)	ข้างทางศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้ง กระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี
EM 86	เปลือกไม้ (แสม)	ข้างทางศูนย์การศึกษาการพัฒนา อ่าวคุ้งกระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี
EM 87	กิ่งโกกงาร่วง	บ้านท่าเสา อ. เขาสมิง จ. ตราด
EM 88	กิ่งโกกงาร่วง	บ้านท่าเสา อ. เขาสมิง จ. ตราด
EM 89	กิ่งโกกงาร่วง	บ้านท่าเสา อ. เขาสมิง จ. ตราด
EM 90	กิ่งไม้ร่วง	บ้านท่าเสา อ. เขาสมิง จ. ตราด
EM 96	ลูกไม้ร่วง	ศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน อ. ท่าใหม่ จ. จันทบุรี

ตารางที่ 6 แสดงสายพันธุ์ยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างใบไม้ร่วงที่เก็บจากป่าชายเลนจังหวัดเพชรบุรี
ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี ภาคใต้ของประเทศไทย

หมายเลขเชื้อ	ชื่อตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง
SM 1	ใบไม้ร่วง	อ. ปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์
SM 2	ใบไม้ร่วง	อ. ปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์
SM 3	ใบไม้ร่วง	อ. บางสะพาน จ. ประจวบคีรีขันธ์
SM 4	ใบไม้ร่วง	อ. บางสะพาน จ. ประจวบคีรีขันธ์
SM 5	ใบไม้ร่วง	อ. บางสะพาน จ. ประจวบคีรีขันธ์
SM 6	ใบไม้ร่วง	อ. บางสะพาน จ. ประจวบคีรีขันธ์
SM 8	ใบไม้ร่วง	อ. บางสะพาน จ. ประจวบคีรีขันธ์
SM 9	ใบไม้ร่วง	อ. บางสะพาน จ. ประจวบคีรีขันธ์
SM 10	ใบไม้ร่วง	อ. บางสะพาน จ. ประจวบคีรีขันธ์
SM 13	ใบไม้ร่วง	อ. สามร้อยยอด จ. ประจวบคีรีขันธ์
SM 14	ใบไม้ร่วง	หาดแหลมหลวง อ. บ้านแหลม จ. เพชรบุรี
SM 15	ใบไม้ร่วง	หาดแหลมหลวง อ. บ้านแหลม จ. เพชรบุรี
SM 16	ใบไม้ร่วง	หาดแหลมหลวง อ. บ้านแหลม จ. เพชรบุรี
SM 17	ใบไม้ร่วง	หาดปึกเตียน อ. ท่ายาง จ. เพชรบุรี
SM 21	ใบไม้ร่วง	สวนป่าเฉลิมพระเกียรติ ปากน้ำปราณบุรี อ. ปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์
SM 22	ใบไม้ร่วง	สวนป่าเฉลิมพระเกียรติ ปากน้ำปราณบุรี อ. ปราณบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์
SM 23	ใบไม้ร่วง	ท่าทอง อ. กาญจนดิษฐ์ จ. สุราษฎร์ธานี
SM 24	ใบไม้ร่วง	ท่าทอง อ. กาญจนดิษฐ์ จ. สุราษฎร์ธานี
SM 25	ใบไม้ร่วง	ท่าทอง อ. กาญจนดิษฐ์ จ. สุราษฎร์ธานี
SM 26	ใบไม้ร่วง	ท่าศาลา อ. ปากพ่นัง จ. สุราษฎร์ธานี
SM 29	ใบไม้ร่วง	ท่าทอง อ. กาญจนดิษฐ์ จ. สุราษฎร์ธานี
SM 30	ใบไม้ร่วง	ท่าทอง อ. กาญจนดิษฐ์ จ. สุราษฎร์ธานี
SM 31	ใบไม้ร่วง	ท่าทอง อ. กาญจนดิษฐ์ จ. สุราษฎร์ธานี

ตารางที่ 6 (ต่อ)

หมายเลขเชื้อ	ชื่อตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง
SM 37	ใบไม้ร่วง	อุทยานแห่งชาติคลองเพรา อ. หลังสวน จ. ชุมพร
SM 40	ใบไม้ร่วง	อุทยานแห่งชาติคลองเพรา อ. หลังสวน จ. ชุมพร
SM 41	ใบไม้ร่วง	อุทยานแห่งชาติคลองเพรา อ. หลังสวน จ. ชุมพร
SM 43	ใบไม้ร่วง	อุทยานแห่งชาติคลองเพรา อ. หลังสวน จ. ชุมพร
SM 48	ใบไม้ร่วง	ปากน้ำตาปี กรมหลวงชุมพร อ. เมือง จ. สุราษฎร์ธานี
SM 49	ใบไม้ร่วง	ปากน้ำตาปี กรมหลวงชุมพร อ. เมือง จ. สุราษฎร์ธานี
SM 52	ใบไม้ร่วง	อ. กาญจนดิษฐ์ จ. สุราษฎร์ธานี
SM 54	ใบไม้ร่วง	ท่าทอง อ. กาญจนดิษฐ์ จ. สุราษฎร์ธานี
SM 56	ใบไม้ร่วง	ท่าทอง อ. กาญจนดิษฐ์ จ. สุราษฎร์ธานี

2. การจัดจำแนกโดยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

การจัดจำแนกยีสต์ในระดับสปีชีส์ในปัจจุบันทำได้โดยการหาลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของหน่วยย่อยโมเลกุลขนาดใหญ่ (large subunit, 26S) ของ rDNA เพื่อนำมาหาความเหมือนของลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 เบส) เทียบกับลำดับเบสของสปีชีส์ที่มีรายงานแล้วหรือที่รู้จักแล้ว (known species) ในฐานข้อมูล และใช้เกณฑ์ของ Kurtzman and Robnett (1998) ในการระบุว่าเป็นสปีชีส์ที่มีรายงานแล้วหรือที่รู้จักแล้ว หรือเป็นสปีชีส์ที่ยังไม่มีรายงานหรือสปีชีส์ใหม่ (undescribed species) โดยพิจารณาจากหลักเกณฑ์คือ ถ้ายีสต์สองสายพันธุ์มีลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA มีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเป็นคนละสปีชีส์

การหาลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 มีวิธีดังนี้

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

การสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ยีสต์ดำเนินการตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lachance *et al.* (1999) ซึ่งมีรายละเอียดขั้นตอน ดังนี้

เตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อสองครั้ง (double sterile) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และแช่ลงในน้ำแข็ง นำไปให้ความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือด (100 องศาเซลเซียส) นาน 5-10 นาที จากนั้นแช่ลงในน้ำแข็งอีกครั้ง เหวี่ยงแยกที่ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1-2 นาที นำของเหลวด้านบน (supernatant) ที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่ไปใช้ในการเพิ่มปริมาณโดเมน D1 และ D2 ของ 26S rDNA โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

2.2 การเพิ่มปริมาณโดเมน D1 และ D2 ของ 26S rDNA

การขยายปริมาณโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA โดยวิธีพีซีอาร์ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Kurtzman และ Robnett (1998) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) เป็น forward primer และ NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) (Kurtzman, 1998) เป็น reverse primer

เตรียม PCR mixture reaction ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต DNA polymerase (QIAGEN, Germany) มีองค์ประกอบดังนี้

Double sterile distilled water	7.75	ไมโครลิตร
Reaction buffer	2.5	ไมโครลิตร
MgCl ₂ (25 mM)	2.3	ไมโครลิตร
5x-Q solution	5	ไมโครลิตร
dNTP (25 mM)	0.2	ไมโครลิตร
NL1 (20 pmol)	1	ไมโครลิตร
NL4 (20 pmol)	1	ไมโครลิตร
Taq (QIAGEN)	0.25	ไมโครลิตร

DNA template

5 ไมโครลิตร

นำส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้จากการเตรียมข้างต้นไปขยายปริมาณโดเมน D1 และ D2 ของ 26S rDNA โดยทำพีซีอาร์ 40 รอบโดยสภาวะ denaturation step (94 องศาเซลเซียส) 1 นาที annealing step (52 องศาเซลเซียส) 2 นาที และ extension step (72 องศาเซลเซียส) 2 นาที ขั้นสุดท้ายหลัง extension step ในรอบสุดท้าย ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (Kurtzman and Robnett, 1998) หลังจากขยายปริมาณโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA โดยเทคนิคพีซีอาร์แล้ว ตรวจสอบ PCR product ของโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA โดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ *Hind* III เป็น marker

2.3 การทำบริสุทธิ์ PCR product ของโดเมน D1 และ D2 ของ 26S rDNA

PCR product ของโดเมน D1 และ D2 ของ 26S rDNA ทำให้ง่ายต่อการใช้ QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีที่แนะนำจากบริษัทผู้ผลิต โดยเติม PB buffer ลงไปผสมกับ PCR product ของโดเมน D1 และ D2 ของ 26S rDNA ในปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร PCR product ของโดเมน D1 และ D2 ของ 26S rDNA จากนั้นเปิดส่วนผสมทั้งหมดลงใน QIAquick column เหยียงแยกที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30-60 วินาที เทส่วนของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออกมาทิ้งไป เติม PE buffer ลงไป 0.75 มิลลิลิตร เหยียงแยกที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30-60 วินาที เทส่วนของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออกมาทิ้งไป เหยียงแยกที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30-60 วินาที อีกครั้งเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่ค้างอยู่ในคอลัมน์ นำส่วนในของชุดคอลัมน์ไปวางลงใน microfuge tube อันใหม่ และทิ้งไว้ให้แห้ง นานประมาณ 5-10 นาที ทำบริสุทธิ์ PCR product ของโดเมน D1 และ D2 ของ 26S rDNA ด้วย double distilled water ปริมาตร 18 ไมโครลิตร เหยียงแยกที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที ส่วนของ PCR product ของโดเมน D1 และ D2 ของ 26S rDNA จะถูกชะล้างสู่ microfuge tube อันใหม่ จากนั้นนำ PCR product ของโดเมน D1 และ D2 ของ 26S rDNA ที่ได้ในขั้นตอนนี้ไปตรวจสอบความเข้มข้นโดยอาศัยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งใช้ 100 bp DNA ladder (QIAGEN, Germany) เป็น DNA marker

2.4 Cycle Sequencing

เตรียม Cycle Sequencing ของยีสต์ โดยใช้ BigDye Terminator Kit version 3.1 (Applied Biosystems, USA) ซึ่งอาศัยไพรเมอร์ NL1 และ NL4 ซึ่งปฏิกิริยาของ cycle sequencing

เตรียมโดยมีองค์ประกอบดังนี้

Ready Reaction Premix (2X)	2	ไมโครลิตร
BigDye Sequencing Buffer (5X)	2	ไมโครลิตร
Primer (3.2 pmol)	1	ไมโครลิตร
D1/ D2 ของ 26S rDNA template (ปริมาณที่ใช้ขึ้นกับความเข้มข้น)		
Double distilled water (เติมให้ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาเป็น 20 ไมโครลิตร)		

ขยายปริมาณ PCR product ของโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ด้วยเทคนิค ฟิชเชอร์ 25 รอบโดยใช้สภาวะดังนี้

Denaturation step (96 องศาเซลเซียส)	10	วินาที
Annealing step (50 องศาเซลเซียส)	5	วินาที
Extension step (60 องศาเซลเซียส)	240	วินาที

นำ cycle sequencing reaction ในขั้นตอนก่อนมาทำบริสุทธิ์ โดยเปิด cycle sequencing sample ลงใน microfuge tube อันใหม่ เติม EDTA (125mM) และ Absolute Ethanol ลงไป 5 และ 60 ไมโครลิตรตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที เหวี่ยงแยกที่ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ปิดฝาส่วนของเหลวทิ้งไป จากนั้นเติม 70% Ethanol ลงไป 250 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน เหวี่ยงแยกที่ 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปิดฝาส่วนของเหลวทิ้งไป นำไปทำให้แห้ง

นำไปทำการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอโดยใช้ DNA Sequencer หรือ Genetic Analyzer

2.5 Phylogenetic analysis

DNA sequence ที่ได้จากข้อ 2.4 จะถูกนำมาทำการ aligned ด้วยซอฟต์แวร์ Clustal X 1.81 หลังจากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงมาสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ โดยใช้ neighbor-joining program ของ Clustal X

3. การจัดจำแนกยีสต์โดยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม

นำไอโซเลตที่เป็นสปิซีส์ใหม่มาศึกษาลักษณะต่างๆ ที่ใช้สำหรับการจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมตามวิธีมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษาลักษณะต่างๆ เพื่อการจัดจำแนกประเภทของยีสต์ ทำตามวิธีของ Yarrow (1998) ในหนังสือ The Yeasts, A Taxonomic Study, 4th edition ซึ่งมี Kurtzman and Fell เป็นบรรณาธิการ ดังนี้

3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เตรียมอาหาร YM agar (ยีสต์เอกซ์แทรกซ์ 3 กรัม มอลต์เอกซ์แทรกซ์ 3 กรัม เปปโทน 5 กรัม เดกซ์โทรส 10 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร) และนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เทอาหาร YM agar ลงในจานเพาะเชื้อ หลังจากนั้นจึง streak (streak) เชื้อที่แยกได้บนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง แล้วนำมาทำ wet mount โดยใช้น้ำกลั่น พร้อมทั้งนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และวาดรูปประกอบ สังเกตสี ลักษณะโคโลนี ลักษณะรูปร่าง และกลไกการเพิ่มจำนวนของเซลล์

3.2 การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี (Diazonium Blue B)

เลี้ยงยีสต์ลงบน YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเท Diazonium Blue B reagent เตรียมโดยละลาย Diazonium Blue B salt ใน 0.25 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane

(Tris) buffer, pH 7.0 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จนท่วมโคโลนีของยีสต์ สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นถ้ายีสต์นั้นทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูปีไดโคโลนีจะมีสีแดงเข้ม หรือแดงม่วงภายใน 1-2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.3 การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส (urease)

เลี้ยงยีสต์ลงบน YM agar slant เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มา streak ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Christensen's urea agar slant (เปปโทน 1 กรัม เดกซ์โทรส 1 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัม ฟีนอลเรด 0.012 กรัม วุ้น 20 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 6.8) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบผลโดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของ pH indicator ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ายีสต์นั้นสามารถสร้างเอนไซม์ยูเรียเอสได้ อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูเข้ม

3.4 การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม

ตรวจสอบการสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม โดยใช้ Dalmau Plate Technique เทอาหาร YM agar ลงในงานเพาะเชื้อ ใช้เข็มเจาะเชื้อจุดเชื้อที่จะทำการทดสอบเป็นเส้นตรงในงานเพาะเชื้อ ใช้กระจกปิดสไลด์ที่ปลอดเชื้อปิดทับบริเวณใดบริเวณหนึ่งของเส้นตรง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7-10 วัน ตรวจสอบการสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์บริเวณใต้กระจกปิดสไลด์และนอกกระจกปิดสไลด์

3.5 การสร้างแอสโคสปอร์

เลี้ยงยีสต์ลงบน YM agar slant ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ลงบน sporulation medium 2 ชนิด คือ Fowell's acetate agar และ 5% Malt extract agar ที่เตรียมเป็น slant โดยการใช้เชื้อจำนวนมาก streak ให้ทั่วผิวหน้าของ slant บ่มที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลการสร้างแอสโคสปอร์ ที่เวลา 3, 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน โดยการทำ wet mount และตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกเวลาที่สร้างแอสโคสปอร์ รูปร่าง และจำนวนรูปร่างแอสกัส และลักษณะของแอสกัสว่ายังคงอยู่ (persistent) หรือหายไป

3.6 ทดสอบทางชีวเคมี

3.6.1 การหมักสารประกอบคาร์บอน

เตรียม basal medium (ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ 3 กรัม เปปโทน 5 กรัม และ น้ำกลั่น 1 ลิตร) แล้วเติม bromothymol blue ลงไปซึ่งทำให้อาหารมีสีเขียวเข้ม ปิเปต basal medium ที่มี bromothymol blue ลงในหลอดทดสอบที่มี durham tube ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเย็นเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบ ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่าน membrane filter ขนาดรูกรอง (pore size) 0.2 ไมครอน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2% โดยน้ำหนัก (ยกเว้นน้ำตาลราฟไฟโนส ที่ต้องทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 4% โดยน้ำหนัก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลอด เตรียมเซลล์แขวนลอยของยีสต์ที่เลี้ยงบน YM agar อายุ 24-48 ชั่วโมงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ หยอดเซลล์แขวนลอยลงในอาหารแต่ละหลอด โดยใช้หลอดหยด (pasteur pipette) 1 หยด นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบผลการหมักโดยการสังเกตปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้นและสีของ pH indicator ที่เปลี่ยนแปลงไปทุกวันในช่วง 1-7 วัน และที่ 14, 21 และ 28 วัน

ปริมาณของแก๊ส แสดงระดับของการหมักดังต่อไปนี้

- + = การหมักรุนแรง (strong positive) มีแก๊สเต็มหลอดดักแก๊สภายใน 7 วัน
- l = การหมักเริ่มเกิดขึ้นช้า (latent positive) แต่มีแก๊สเต็มหลอดดักแก๊สอย่างรวดเร็วหลังบ่ม 7 วัน
- s = การหมักช้า (slowly positive) มีแก๊สเต็มหลอดดักแก๊สหลัง 7 วัน
- w = การหมักอ่อน (weak positive) มีฟองแก๊สบางส่วนในหลอดดักแก๊ส
- = ไม่มีการหมัก ไม่มีฟองแก๊สในหลอดดักแก๊ส
- v = การหมักผันแปร (variable positive) บางสายพันธุ์เป็นบวก บางสายพันธุ์เป็นลบ

3.6.2 แอสซิมิลชันสารประกอบคาร์บอน

เตรียมน้ำกลั่นในหลอดทดสอบ หลอดละ 1.8 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเย็นเติม nitrogen base medium (ยีสต์ในโตรเจนเบส 6.7 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร) ที่มีสารประกอบคาร์บอนที่จะทดสอบ ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่าน membrane filter ขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารในหลอดทดสอบ เตรียมเซลล์แขวนลอยของยีสต์ที่เลี้ยงบน YM agar อายุ 24-48 ชั่วโมงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ หยดเซลล์แขวนลอยใส่ลงในอาหารแต่ละหลอด โดยใช้หลอดหยด 1 หยด นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบหลังจากบ่ม 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ด้วยการตรวจระดับการเจริญทำโดยใช้กระดาษขาวขีดเส้นสีดำหนา 0.75 มิลลิเมตร ห่างกันประมาณ 5 มิลลิเมตร ทาบหลอดบนกระดาษมองผ่านหลอดที่เลี้ยงเชื้อและสังเกตเส้นสีดำ ดังนี้

- 3+ = การเจริญทำให้เชื้อมีความขุ่นลบเส้นสีดำอย่างสมบูรณ์
- 2+ = เห็นเส้นสีดำพริ้วๆ
- 1+ = เห็นเส้นสีดำแต่ขอบเห็นไม่ชัดเจน (ในกรณีที่ให้ผลเป็น 1+ ควรทำซ้ำอีกครั้ง โดยใช้เข็มเจาะเชื้อติดเชื้อจากหลอดที่เป็น 1+ ลงสู่อาหารใหม่)
- = เห็นเส้นสีดำขอบชัดเจน

รายงานผลจากการตรวจระดับการเจริญ

- + = บวก (positive) คือ อ่านผลเป็น 2+ หรือ 3+ หลังจาก 1 หรือ 2 สัปดาห์
- l หรือ d = บวกล่าช้า (latent ,delayed positive) คือ อ่านผลเป็น 2+ หรือ 3+ อย่างรวดเร็ว แต่หลังจาก 2 สัปดาห์
- s = บวกช้า (slow positive) คือ อ่านผลเป็น 2+ หรือ 3+ ช้าๆ ในระยะเวลาที่มากกว่า 2 สัปดาห์
- w = บวกอ่อนๆ (weak positive) คือ อ่านผล 1+
- = ลบ (negative)

(+)	=	นาน/บางทีๆ จึงมีผลบวก (seldom positive)
v	=	ผันแปร (variable) คือ บางสายพันธุ์เป็นบวก และบางสายพันธุ์เป็นลบ
+/-	=	บวกหรือบวกน้อย คือ ทุกสายพันธุ์เจริญ แต่บางสายพันธุ์เจริญช้า
w/-	=	บวกอ่อนๆ หรือ ลบ

3.6.3 แอสซิมิเลชันสารประกอบไนโตรเจน

แอสซิมิเลชันสารประกอบไนโตรเจนทำตามวิธีของ Lodder and Kreger-van Rij (1952) เพาะเชื้อลงบน YM agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-4 วัน เตรียมเซลล์แขวนลอยของยีสต์ใน yeast carbon base broth (ยีสต์คาร์บอนเบส 1.17 กรัม น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร บรรจุหลอดละ 2 มิลลิลิตร) โดยใช้เชื้อที่เลี้ยงบน YM agar อายุ 2-4 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำ yeast carbon base broth หยดลงบนอาหารแข็งที่เติมสารประกอบไนโตรเจนแต่ละชนิดลงไปแล้ว โดยที่สารประกอบไนโตรเจน ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่าน membrane filter ขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด สังเกตการเจริญทุก 2 วัน จนครบ 15 วัน บันทึกการเจริญเป็น 3+, 2+, 1+ และ – โดยเปรียบเทียบขนาดโคโลนีของเชื้อชนิดเดียวกันที่เจริญในอาหารที่เติมสารประกอบไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งใช้เป็น positive control และอาหารที่ไม่มีการเติมสารประกอบไนโตรเจน ซึ่งใช้เป็น negative control

3.7 การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน

เตรียมอาหารที่ปราศจากวิตามิน (vitamin-free medium) (ประกอบด้วยกลูโคส 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.25 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.01 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.005 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคลอไรด์ 0.001 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 0.001 เปอร์เซ็นต์) นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที เตรียมเซลล์แขวนลอยของยีสต์ที่เลี้ยงบน YM agar อายุ 24-48 ชั่วโมง ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ หยดเซลล์แขวนลอยใส่ลงในอาหารแต่ละหลอดโดยใช้หลอดหยด 1 หยด นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบผลหลังจากบ่ม 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ด้วยการตรวจระดับการเจริญ ทำโดย

ใช้กระดาษขาวจืดเส้นสีดำหนา 0.75 มิลลิเมตร ห่างกันประมาณ 5 มิลลิเมตร ทาบหลอดบนกระดาษมองผ่านหลอดที่เลี้ยงเชื้อและสังเกตเส้นสีดำ รายงานการเจริญเป็นบวกหรือลบ

3.8 การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง

เตรียม 50% glucose agar (กลูโคส 500 กรัม สารละลายยีสต์เอกซ์แทรกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 13 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) และ 60% glucose agar (กลูโคส 600 กรัม สารละลายยีสต์เอกซ์แทรกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ วุ้น 22.5 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร) ใส่หลอดทดสอบ นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที เตรียมกล้าเชื้อโดยเพาะเชื้อลงบน YM agar ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง จาก YM agar มา streak ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร 50% glucose agar slant และ 60% glucose agar slant บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการเจริญบน agar slant หลังจากบ่ม 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์

3.9 การเจริญบนอาหารที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์และกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์และกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์

เตรียมอาหารเหลวที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์และกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ (โซเดียมคลอไรด์ 100 กรัม กลูโคส 50 กรัม ยีสต์ไนโตรเจนเบส 6.7 กรัม น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) และอาหารเหลวที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์และกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ (โซเดียมคลอไรด์ 160 กรัม กลูโคส 50 กรัม ยีสต์ไนโตรเจนเบส 6.7 กรัม น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) นำไปฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เลี้ยงเชื้อบน YM agar ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เชื้อที่ได้นำมาเพาะลงในอาหารที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์และกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์และกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบการเจริญหลังจากบ่ม 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์

3.10 การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิอื่นๆ

เลี้ยงยีสต์ลงบน YM agar ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพาะเชื้อที่ได้ โดยการสตรีกลงบน YM agar และบ่มที่อุณหภูมิที่ต้องการทดสอบ เป็นเวลา 3-4 วัน ตรวจการเจริญบน YM agar

ผลและวิจารณ์

ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้แยกจากตัวอย่างกิ่งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วง ที่เก็บจากป่าชายเลนในจังหวัดตราดและจันทบุรี ภาคตะวันออกของประเทศไทยจำนวน 38 ไอโซเลต (รหัสชื่อเป็น EM) และในจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี ภาคใต้ของประเทศไทยจำนวน 32 ไอโซเลต (รหัสชื่อเป็น SM) รวมทั้งหมด 70 ไอโซเลต

สำหรับการใช้ลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA (ขนาดประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งในการจัดจำแนกยีสต์นั้น Kurtzman and Robnett (1998) อธิบายไว้ว่า ในการเปรียบเทียบลำดับเบสถ้ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเป็นคนละสปีชีส์ และจากการศึกษาแอสโคไมซีตยีสต์จำนวนประมาณ 500 สปีชีส์ พบว่าสายพันธุ์ในสปีชีส์เดียวกันมีนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 0-2 นิวคลีโอไทด์ และถ้ามีนิวคลีโอไทด์ต่างกันมากกว่า 3 นิวคลีโอไทด์จัดเป็นคนละสปีชีส์ จากการนำลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ที่ศึกษามาเทียบกับลำดับเบสของสปีชีส์ที่มีรายงานแล้วหรือที่รู้จักแล้ว (known species) ใน GenBank โดยใช้ BLAST program แสดงว่ายีสต์ 70 ไอโซเลตที่ศึกษามีไอโซเลตที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ที่มีรายงานแล้ว จำนวน 53 ไอโซเลต (ตารางที่ 7 และ 8) เนื่องจากมีลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ต่างกันกับสปีชีส์อื่นๆ เพียง 0-2 นิวคลีโอไทด์ โดยเป็นยีสต์ที่แยกจากอินทรียวตฤในป่าชายเลน ภาคตะวันออกของประเทศไทยซึ่งจัดจำแนกอยู่ใน Phylum Ascomycota, Class Hemiascomycetes, Order Saccharomycetales จำนวน 15 ไอโซเลตที่อยู่ใน Family Saccharomycetaceae จัดจำแนกเป็น 5 สกุล 6 สปีชีส์ คือ *Issatchenkia orientalis* (EM67, EM 70 และ EM 72), *Debaryomyces pseudopolymorphus* (EM69, EM 85, EM 86, EM 87, EM 88 และ EM 89), *Kodamaea ohmeri* (EM 45), *Pichia guilliermondii* (EM 38 และ EM 48), *Williopsis saturnus* var. *subsufficiens* (EM 74 และ EM 78) และ *D. vanrijae* var. *yarowia* (EM 42) สำหรับ 14 ไอโซเลตที่อยู่ใน Family Candidaceae จัดจำแนกเป็น 2 สกุล 8 สปีชีส์ คือ *Candida silvae* (EM 4, EM 73, EM 77 และ EM 80), *C. intermedia* (EM 54), *C. tropicalis* (EM 14, EM 25 และ EM 90), *C. fermentati* (EM 63), *C. fukuyamaensis* (EM 46), *C. natalensis* (EM 82), *C. parapsilosis* (EM 41) และ *Geotrichum* sp. MTCC 3974 (EM 6 และ EM 17) และยีสต์ที่แยกจากอินทรียวตฤในป่าชายเลน ภาคใต้ของประเทศไทย ที่อยู่ใน Family Saccharomycetaceae จัดจำแนกเป็น 3 สกุล 5 สปีชีส์ คือ *I. orientalis* (SM 5, SM 15, SM 23 และ SM 24), *P. syndowiorum* (SM 1, SM 2, SM 31, SM 41

และ SM 43), *I. occidentalis* (SM 14 และ SM 30), *K. ohmeri* (SM 3, SM 8 และ SM 9) และ *Kodameae* sp. (SM 29) สำหรับ 9 ไอโซเลตที่อยู่ใน Family Candidaceae จัดจำแนกเป็น 1 สกุล 5 สปีชีส์ คือ *C. silvae* (SM 10 และ SM 26), *C. intermedia* (SM 48 และ SM 54), *C. palmioleophila* (SM 49 และ SM 52), *C. pseudointermedia* (SM 21 และ SM 22) และ *Candida* sp. NRRL Y-27698 (SM 13)

ยีสต์สปีชีส์ที่มีรายงานแล้วทั้งที่พบในป่าชายเลน ภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย ส่วนใหญ่จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Candida* เนื่องจากพบว่ายีสต์ในสกุลนี้เป็นยีสต์ส่วนใหญ่ที่สามารถพบในป่าชายเลน (Araujo, 1995) จากผลการทดลองยังพบว่า *I. orientalis*, *K. ohmeri*, *C. silvae* และ *C. intermedia* เป็นยีสต์ที่สามารถพบได้ทั้งในอินทรีย์วัตถุในป่าชายเลน ภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นยีสต์ที่แยกจากตัวอย่างใบไม้ร่วงเป็นไปได้ว่ายีสต์ที่กล่าวมาข้างต้นสามารถพบได้บนตัวอย่างที่เป็นใบไม้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถพบยีสต์สปีชีส์ที่มีรายงานแล้วที่พบในป่าชายเลน ภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย ในตัวอย่างอื่นๆ ที่หลากหลาย เช่น *C. fermentati*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *D. vanrijae* var. *yarowia* และ *K. ohmeri* เป็นยีสต์ที่มีรายงานว่าสามารถพบได้ในตัวอย่างดินในอุทยานแห่งชาติ น้ำหนาว (ธวัชชัย, 2549) และจากการศึกษาของศศิธร (2549) พบ *C. parapsilosis* และ *K. ohmeri* ในตัวอย่างดอกไม้ *C. fukuyamaensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *K. ohmeri*, *P. syndowiorum* และ *Williopsis saturnus* var. *subsufficiens* พบในตัวอย่างขุยแมลง *P. syndowiorum* พบในตัวอย่างตะไคร่น้ำ *C. parapsilosis* และ *C. tropicalis* พบในตัวอย่างเห็ด

ตารางที่ 7 แสดงการจัดจำแนกยีสต์ที่เป็นสปีชีส์ที่มีรายงานแล้วที่แยกจากตัวอย่างกิ่งไม้ร่วง ใบไม้ร่วง เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วง ที่เก็บจากป่าชายเลน จังหวัดตราดและจันทบุรี ภาคตะวันออกของประเทศไทย

รหัส เชื้อ	Accession number	Closest species (Accession Number)	Nucleotide identity		Nucleotide different		
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap
EM 4	AB281077	<i>Candida silvae</i> VTT C-04527 (DQ377641)	549/ 549	100	0	0	0
EM 6	AB281296	<i>Geotrichum</i> sp. MTCC 3974 (AY225313)	549/ 551	99.6	2	0.3	0
		<i>Geotrichum silvicola</i> UFMG -354-2 (AY158042)	538/ 541	99.4	3	0.5	0
EM 14	AB281286	<i>Candida tropicalis</i> 137 (AJ749824)	587/ 589	99.6	2	0.3	0
EM 17	AB281297	<i>Geotrichum</i> sp. MTCC 3974 (AY225313)	553/ 555	99.6	2	0.3	0
		<i>Geotrichum silvicola</i> UFMG -354-2 (AY158042)	546/ 550	99.2	4	0.4	0
EM 25	AB281287	<i>Candida tropicalis</i> 137 (AM114923)	558/ 560	99.6	1	0.1	1
EM 38	AB281302	<i>Pichia guilliermondii</i> EXOC8 (AM160625)	577/ 578	99.8	1	0.1	0
EM 41	AB281076	<i>Candida parapsilosis</i> EXOC16 (AY894827)	580/ 580	100	0	0	0

ตารางที่ 7 (ต่อ)

รหัส เชื้อ	Accession number	Closest species (Accession Number)	Nucleotide identity		Nucleotide different		
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap
EM 42	AB281295	<i>Debaryomyces vanrijiae</i> var. <i>yarowii</i> NRRL Y-7535 (U45843)	568/ 570	99.6	2	0.3	0
EM 45	AB281301	<i>Kodamaea ohmeri</i> ATCC 46053 (AF335976)	512/ 512	100	0	0	0
EM 46	AB279728	<i>Candida fukuyamaensis</i> NRRL Y-17857 (U62311)	564/ 565	99.8	1	0.1	0
EM 48	AB281303	<i>Pichia guilliermondii</i> EXOC8 (AM160625)	576/ 578	99.6	2	0.3	0
EM 54	AB279729	<i>Candida intermedia</i> VTT C04520 (DQ377635)	536/ 539	99.4	2	0.3	1
EM 63	AB279727	<i>Candida fermentati</i> NRRL Y-27401 (AY187283)	547/ 550	99.4	2	0.3	1
EM 67	AB281298	<i>Issatchenkia orientalis</i> ESAB8 (AJ749825)	572/ 572	100	0	0	0
EM 69	AB281289	<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i> NRRL Y 8-4229 (U45845)	498/ 501	99.4	3	0.5	0
EM 70	AB281299	<i>Issatchenkia orientalis</i> ESAB8 (AJ749825)	569/ 572	99.4	0	0	3

ตารางที่ 7 (ต่อ)

รหัส เชื้อ	Accession number	Closest species (Accession Number)	Nucleotide identity		Nucleotide different		
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap
EM 72	AB281300	<i>Issatchenkia orientalis</i> ESAB8 (AJ749825)	583/ 583	100	0	0	0
EM 73	AB281078	<i>Candida silvae</i> VTT C-04527 (DQ377641)	558/ 558	100	0	0	0
EM 74	AB281304	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i> NRRL YB-1657 (U75960)	566/ 568	99.6	1	0.1	1
EM 77	AB281079	<i>Candida silvae</i> VTT C-04527 (DQ466542)	528/ 531	99.4	2	0.3	1
EM 78	AB281305	<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>subsufficiens</i> NRRL YB-1657 (U75960)	558/ 559	99.8	1	0.1	0
EM 80	AB281080	<i>Candida silvae</i> VTT C-04527 (DQ377641)	547/ 547	100	0	0	0
EM 82	AB281075	<i>Candida natalensis</i> NRRL Y-17680 (U45818)	555/ 556	99.8	0	0	1
EM 85	AB281290	<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i> NRRL YB-4229 (U45845)	554/ 554	100	0	0	0

ตารางที่ 7 (ต่อ)

รหัส เชื้อ	Accession number	Closest species (Accession Number)	Nucleotide identity		Nucleotide different		
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap
EM 86	AB281291	<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i> NRRL YB-4229 (U45845)	569/ 573	99.3	1	0.1	3
EM 87	AB281292	<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i> NRRL YB-4229 (U45845)	569/ 570	99.8	1	0.1	0
EM 88	AB281293	<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i> NRRL YB-4229 (U45845)	569/ 570	99.8	1	0.1	0
EM 89	AB281294	<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i> NRRL YB-4229 (U45845)	569/ 572	99.4	1	0.1	2
EM 90	AB281288	<i>Candida tropicalis</i> 137 (AY951982)	575/ 576	99.8	1	0.1	0

ตารางที่ 8 แสดงการจัดจำแนกยีสต์ที่เป็นสปีชีส์ที่มีรายงานแล้วที่แยกจากตัวอย่างใบไม้ร่วง ที่เก็บจากป่าชายเลนจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์
ชุมพร และสุราษฎร์ธานี ภาคใต้ของประเทศไทย

รหัส เชื้อ	Accession number	Closest species (Accession Number)	Nucleotide identity		Nucleotide different		
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap
SM 1	AB281325	<i>Pichia syndowiorum</i> WM76A (AJ508573)	569/ 569	100	0	0	0
SM 2	AB281326	<i>Pichia syndowiorum</i> WM76A (AJ508573)	570/ 570	100	0	0	0
SM 3	AB281321	<i>Kodamaea ohmeri</i> ATCC 46053 (AF335976)	454/456	99.6	2	0.4	0
SM 5	AB281317	<i>Issatchenkia orientalis</i> ESAB8 (AJ749825)	570/ 571	99.8	0	0	1
SM 8	AB281322	<i>Kodamaea ohmeri</i> ATCC 46053 (AF335976)	499/ 501	99.5	2	0.4	0
SM 9	AB281323	<i>Kodamaea ohmeri</i> ATCC 46053 (AF335976)	493/ 493	100	0	0	0
SM 10	AB281312	<i>Candida silvae</i> VTT C-04527 (DQ377641)	541/ 542	99.8	0	0	1
SM 13	AB281314	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27698 (AB217514)	332/ 332	100	0	0	0
SM 14	AB281315	<i>Issatchenkia occidentalis</i> NRRL Y-7552 (U76348)	559/ 559	100	0	0	0
SM 15	AB281318	<i>Issatchenkia orientalis</i> ESAB8 (AJ749825)	570/ 570	100	0	0	0

ตารางที่ 8 (ต่อ)

รหัส เชื้อ	Accession number	Closest species (Accession Number)	Nucleotide identity		Nucleotide different		
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap
SM 21	AB281310	<i>Candida pseudointermedia</i> (AF374611)	518/ 518	100	0	0	0
SM 22	AB281311	<i>Candida pseudointermedia</i> (AF374611)	518/ 518	100	0	0	0
SM 23	AB281319	<i>Issatchenkia orientalis</i> ESAB8 (AJ749825)	572/ 572	100	0	0	0
SM 24	AB281320	<i>Issatchenkia orientalis</i> ESAB8 (AJ749825)	572 / 572	100	0	0	0
SM 26	AB281313	<i>Candida silvae</i> VTT C-04527 (DQ377641)	541/ 541	100	0	0	0
SM 29	AB281324	<i>Kodamaea</i> sp. YS9 (DQ358871)	436/ 439	99.3	3	0.6	0
SM 30	AB281316	<i>Issatchenkia occidentalis</i> NRRL Y-7552 (DQ466536)	561/ 561	100	0	0	0
SM 31	AB281327	<i>Pichia sydowiorum</i> WM76A (AJ508573)	570/ 570	100	0	0	0
SM 41	AB281328	<i>Pichia sydowiorum</i> WM76A (AJ508573)	570/ 570	100	0	0	0
SM 43	AB281329	<i>Pichia sydowiorum</i> WM76A (AJ508573)	570/ 570	100	0	0	0
SM 48	AB281306	<i>Candida intermedia</i> VTT C-04520 (DQ377635)	536/ 538	99.6	1	0.1	1

ตารางที่ 8 (ต่อ)

รหัส เชื้อ	Accession number	Closest species (Accession Number)	Nucleotide identity		Nucleotide different		
			no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap
SM 49	AB281308	<i>Candida palmioleophila</i> NRRL Y-17323 (U45758)	567/ 567	100	0	0	0
SM 52	AB281309	<i>Candida palmioleophila</i> NRRL Y-17323 (U45758)	566/ 567	99.8	1	0.1	0
SM 54	AB281307	<i>Candida intermedia</i> VTT C-04520 (DQ377635)	535/ 538	99.4	2	0.3	1

ยีสต์จำนวน 12 ไอโซเลตเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์เกิน 1 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุด (closest species) จึงจัดเป็นสปีชีส์ใหม่ตามเกณฑ์ของ Kurtzman and Robnett (1998) โดยพบว่าเป็นยีสต์ที่แยกจากพืชในป่าชายเลนในภาคตะวันออกของประเทศไทย จำนวน 5 ไอโซเลต คือ EM 9 (แยกจากเปลือกไม้), EM 33 (แยกจากเปลือกไม้ – โกงกางใบเล็ก), EM 40 (แยกจากกิ่งไม้ร่วง), EM 57 (แยกจากใบไม้ร่วง) และ EM 65 (แยกจากใบไม้ร่วง) ยีสต์ที่แยกจากพืชในป่าชายเลนในภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 7 ไอโซเลต คือ SM 4, SM 6, SM 16, SM 17, SM 37, SM 40 และ SM 56 (ทั้งหมดแยกจากใบไม้ร่วง) แสดงในตารางที่ 9 โดยสปีชีส์ใหม่จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* และ *Pichia* ซึ่งจากการค้นพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ของ รัชชชัย (2549) พบยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Candida*, *Pichia* และ *Tetrapisispora* ซึ่งแยกจากตัวอย่างดินในอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว และการค้นพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ของศศิธร (2549) พบยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera* และ *Trichosporon* ซึ่งแยกจากตัวอย่างดอกไม้ ขุยมะพร้าว ตะไคร่น้ำ ใบไม้ และเห็ด ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้ว่าตัวอย่างในการศึกษาที่มีความหลากหลายสามารถพบยีสต์ที่หลากหลายเช่นเดียวกัน และจากการที่ประเทศไทยมีภูมิอากาศแบบร้อนชื้นทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์เร็ว ซึ่งมีผลทำให้ประชากรยีสต์มีการเปลี่ยนแปลงไปด้วย

นอกจากนี้ยังมียีสต์ที่อาจเป็นสปีชีส์ใหม่หรือสปีชีส์ที่มีรายงานแล้ว จำนวน 5 ไอโซเลต แสดงในตารางที่ 10 เนื่องจากการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA มากกว่า 4 นิวคลีโอไทด์แต่ไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทราบแน่นอนจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน โดยยีสต์ดังกล่าว ได้แก่ EM2, EM 53, EM 64, EM 96 และ SM 25

ตารางที่ 9 แสดงการจัดจำแนกยีสต์ที่เป็นสปีชีส์ใหม่ จากตัวอย่างพืชที่แยกจากป่าชายเลน ภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทย

รหัส เชื้อ	Closest species (Accession Number)	Nucleotide identity		Nucleotide different		
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap
EM 9	<i>Candida</i> sp. YS55 (AM236017)	497/ 504	98.6	7	1.38	0
	<i>Candida maltosa</i> NRRL Y-17677 (U45745)	496/ 504	98.4	8	1.58	0
EM 33	<i>Candida haemulonii</i> CBS 7798 (AJ508564)	448/ 558	80.3	26	4.65	84
EM 40	<i>Candida cf. glabrata</i> UW (PS) 98-110.4 (AF313362)	580/ 590	98.3	10	1.68	0
EM 57	<i>Debaryomyces nepalensis</i> NRRL Y-7108 (U45839)	564/ 574	98.2	6	1.04	4
EM 65	<i>Candida sinolaborantium</i> CBS 9940 (AY964681)	501/ 515	97.2	9	2.33	2
SM 4	<i>Pichia anomala</i> JCM 5209 (AB180744)	551/ 573	96.2	20	3.84	2
SM 6	<i>Candida silvae</i> G126 (DQ377641)	436/ 445	98.0	9	2.02	0
SM 16	<i>Candida tropicalis</i> DY-Y-2A (AM114923)	451/ 476	94.7	20	4.20	5
SM 17	<i>Kluyveromyces nonfermentans</i> S8 (AB217517)	546/ 556	98.2	10	1.79	0

ตารางที่ 9 (ต่อ)

รหัส เชื้อ	Closest species (Accession Number)	Nucleotide identity		Nucleotide different		
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap
SM 37	<i>Candida</i> sp. BG02-6-6-2-1 (AY520416)	475/ 508	93.5	28	5.51	5
	<i>Debaryomyces nepalensis</i> NRRLY-7108 (U45839)	475/ 508	93.5	28	5.51	5
SM 40	<i>Candida bracarensis</i> 153M (AY589572)	553/ 578	95.7	15	2.59	10
SM 56	<i>Candida</i> sp. NRRL Y-27948 (DQ655694)	382/ 598	63.9	15	2.51	201

ตารางที่ 10 แสดงการจัดจำแนกยีสต์ที่อาจเป็นสปีชีส์ใหม่ หรือสปีชีส์ที่มีรายงานแล้ว จากตัวอย่างพืชที่แยกจากป่าชายเลน ภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศไทย

รหัส เชื้อ	Closest species (Accession Number)	Nucleotide identity		Nucleotide different		
		no. of nucleotides identity / total nucleotides	% identity	no. of nucleotide substitutions	% substitution	no. of gap
EM 2	<i>Debaryomyces nepalensis</i> NRRL Y-7108 (U45839)	556/ 562	98.9	4	0.7	2
EM 53	<i>Pichia</i> sp. ST-4 (DQ400363)	576/ 579	99.4	3	0.5	0
	<i>Pichia pijperi</i> NRRL YB-4309 (U75418)	565/ 570	99.1	5	0.8	0
EM 64	<i>Debaryomyces nepalensis</i> NRRL Y-7108 (U45839)	564/ 570	98.9	6	1.05	0
EM 96	<i>Candida insectorum</i> NRRL Y-7787 (U45791)	526/ 530	99.2	4	0.7	0
SM 25	<i>Candida</i> cf. <i>glabrata</i> Y660 (AJ617300)	516/ 522	98.9	4	0.8	2

การจัดจำแนก การตั้งชื่อ และการอธิบายสปีชีส์ใหม่

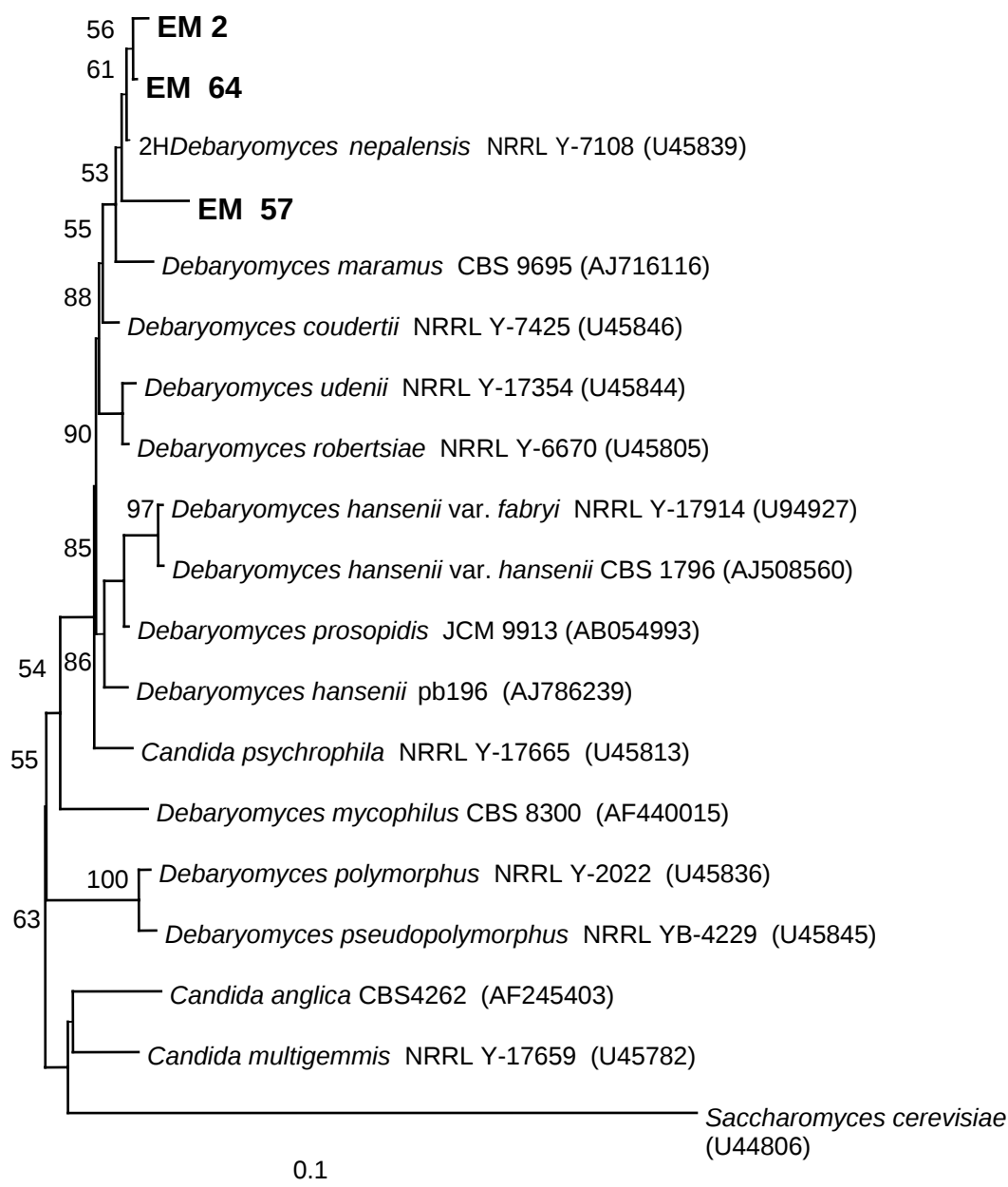
1. *Debaryomyces siamensis* sp. nov. (EM 57)

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ EM 2, EM 57 และ EM 64 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ใกล้เคียงกับ *D. nepalensis* NRRL Y-7108 โดยมีความแตกต่างของลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA เท่ากับการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 4, 6 และ 4 ใน 562, 574 และ 570 นิวคลีโอไทด์ หรือเท่ากับ 0.7, 1.04 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA พบว่า EM 2 และ EM 57 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 10 นิวคลีโอไทด์ใน 550 นิวคลีโอไทด์ ส่วนระหว่าง EM 2 และ EM 64 พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 2 นิวคลีโอไทด์ใน 558 นิวคลีโอไทด์ และระหว่าง EM 57 และ EM 64 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 8 นิวคลีโอไทด์ใน 564 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้น EM 2 และ EM 64 อาจจัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน (conspecific species) หรือสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก (sister species) ในขณะที่น่าจะเป็นคนละสปีชีส์กับ EM 57 ซึ่งสามารถยืนยันได้โดยต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ทำดีเอ็นเอ-ดีเอ็นเอไฮบริดเซชันระหว่างเชื้อคู่ต่างๆ กันในบรรดา 3 สายพันธุ์ เพื่อดูความเหมือนกันของดีเอ็นเอ (DNA homology)

เมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ในภาพที่ 4 พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ใน cluster เดียวกับสปีชีส์ต่างๆ ของสกุล *Debaryomyces* และ cluster กับ *D. nepalensis* NRRL Y-7108 โดย EM 57 อยู่ห่างจาก EM 2 และ EM 64 ซึ่งอยู่ในตำแหน่งที่ใกล้กันมากกว่า (ภาพที่ 4) ซึ่งยืนยันผลการเทียบลำดับเบสที่แสดงว่า EM 57 น่าจะเป็นคนละสปีชีส์กับ EM 2 และ EM 64

สายพันธุ์ EM 2, EM 57 และ EM 64 มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (multipolar) ไม่สามารถสร้างเส้นใยเทียม สร้างแอสโคสปอร์ที่มีรูปร่างกลม จำนวน 1 สปอร์ในแอสค์รูปรางกลม ไม่แอสซิมิเลตในเตรด ไม่ทำปฏิกิริยากับลิโคอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Debaryomyces* ดังนั้นจึงสามารถจัดจำแนกยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นสกุล *Debaryomyces*



ภาพที่ 4 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส EM 2, EM 57 และ EM 64 และ สปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำ จำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

สายพันธุ์ EM 57 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA เท่ากับ 1.07 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สายพันธุ์ EM 2 และ EM 64 มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์เพียง 0.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ *D. nepalensis* ดังนั้นจึงจัดว่า EM 57 เป็นคนละสปีชีส์กับ *D. nepalensis* ตามเกณฑ์ของ Kurtzman and Robnett (1998) นอกจากนั้นยังมีความแตกต่างของฟิโนไทป์เมื่อเทียบกับ *D. nepalensis* คือ สามารถหมักกลูโคส และไม่แอสซิมิเลตเอทานอล ดังนั้นจึงเสนอว่า EM 57 เป็นสปีชีส์ใหม่และตั้งชื่อเป็น *Debaryomyces siamensis* sp. nov. โดยมีสายพันธุ์ EM 57 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “siamensis” เนื่องจาก type strain แยกได้ในประเทศไทยซึ่งมีชื่อเดิมว่าสยาม

ลักษณะของ *Debaryomyces siamensis* sp. nov. (EM 57)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์รูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาด (0.9)-(1.8) x (1.3)-(2.1) ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม เซลล์ตกตะกอนที่ก้นหลอด

การเจริญบนอาหาร YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม ผิวด้าน ขอบมีลักษณะโค้ง/ เว้าเล็กน้อย

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าแอสโคสปอร์รูปร่างกลม จำนวน 1 สปอร์ในแอสคัสรูปร่างกลม

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-

มอลโทส -

เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์ -

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	โซลูเบิลสตาร์ช	+
กาแลกโทส	+	กลีเซอรอล	+
แอล-ซอร์โบส	+	อีรีทริทอล	+
ดี-ไรโบส	+	ไรบิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-กลูซิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	+	ดี-แมนนิทอล	+
ดี-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ไมโอ-อินโนซิทอล	-
ซูโครส	+	ดี-กลูโคโน-1, 5-แลกโตน	+
มอลโทส	+	ดี- กลูคูโรเนต	-
แอลฟา-ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กาแลกทูโรนิก	-
เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	+	ดีแอล-แลกเทต	-
เซลโลไบโอส	+	ซัคซิเนต	+
ซาลิซิน	+	ซิเตรต	+
เมลลิไบโอส	+	เอทานอล	-
แลกโทส	+		
ราฟไฟโนส	+		
เมลไซโทส	+		

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	-	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+
ไนไตรต์	-	คาตาเวอริน	+
เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+		

ลักษณะอื่นๆ:

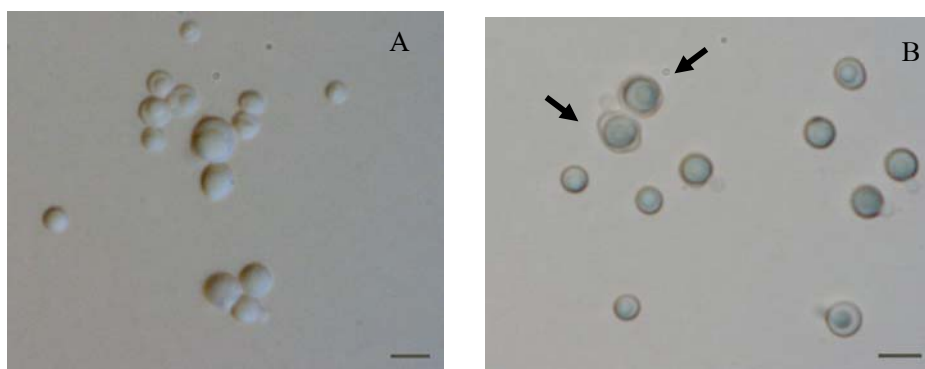
การเจริญที่ 25 °C +	การเจริญบนอาหารแข็งที่มีกลูโคส 50% +
การเจริญที่ 30 °C +	การเจริญบนอาหารแข็งที่มีกลูโคส 60% +
การเจริญที่ 35 °C +	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10% +
การเจริญที่ 37 °C -	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16% +
การเจริญที่ 42 °C -	การทำปฏิกิริยากับสไลโคโซเนียมบลูปี -
การเจริญที่ 45 °C -	การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส -

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ

สำหรับสายพันธุ์ EM 2 และ EM 64 มีลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA เมื่อเทียบกับ *D. nepalensis* มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ไม่เกิน 1 เบอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงยังไม่สามารถระบุได้แน่นอนว่าเป็นคนละสปีชีส์กับ *D. nepalensis* จนกว่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติม



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะวิทยาของ *Debaryomyces siamensis* sp. nov.

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

(B) แอสโคสปอร์รูปร่างกลม จำนวน 1 สปอร์ในแอสคัสรูปร่างกลม (สรชี) สร้างบนอาหาร Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 5 ไมโครเมตร)

ลักษณะของสายพันธุ์ EM 2

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายข้อ

การเจริญในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์รูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาด $(1.1)-(2.0) \times (1.1)-(2.0)$ ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม พบเซลล์ทั่วหลอดและมีฝ้าที่ขอบหลอด

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม ผิวด้าน ขอบมีลักษณะโค้ง/เว้าเล็กน้อย

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 14 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าแอสโคสปอร์รูปร่างกลม ผนังไม่เรียบ จำนวน 1 สปอร์ในแอสคัสรูปร่างกลม

ลักษณะของสายพันธุ์ EM 64

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายข้อ

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์รูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาด $(1.1)-(1.8) \times (1.2)-(2.2)$ ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม พบเซลล์ทั่วหลอดและมีฝ้าที่ขอบหลอด

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม ผิวด้าน ขอบมีลักษณะโค้ง/เว้ามาก

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าแอสโคสปอร์รูปร่างกลม ผนังเรียบ จำนวน 2-4 สปอร์ในแอสคัสรูปร่างกลม

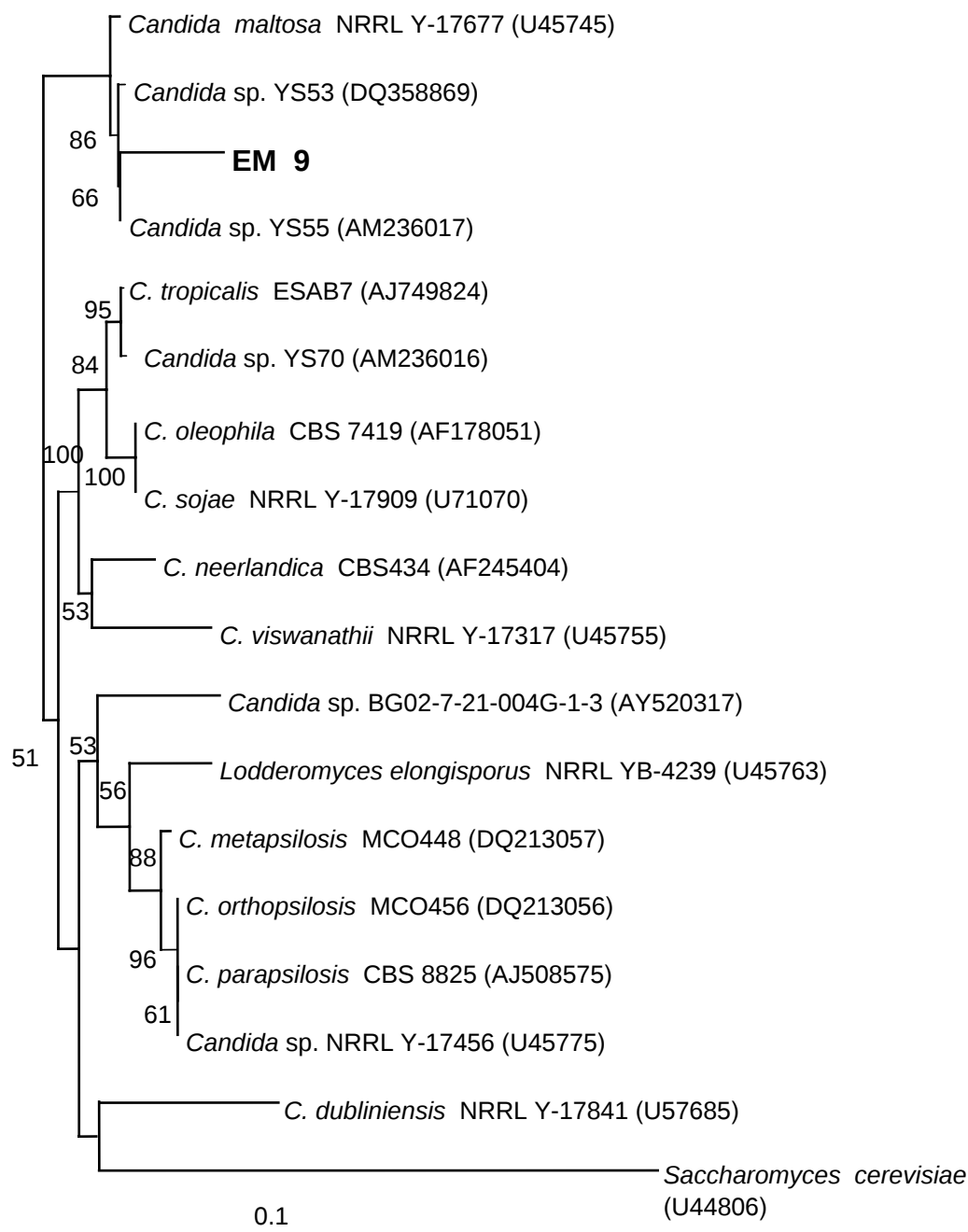
สายพันธุ์ EM 2 มีฟีโนไทป์แตกต่างจากสายพันธุ์ EM 64 คือ สามารถหมักกลูโคส สามารถแอสซิมิเลตเมเลไซโทส แอสซิมิเลตไรบิทอล และดี-กลูโคโน-1,5-แลกโตน ไม่สามารถแอสซิมิเลตไนเตรต สามารถเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์ และบนอาหารที่มีกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์

สำหรับ *D. siamensis* sp. nov. มีฟีโนไทป์แตกต่างจากสายพันธุ์ EM 2 คือ สามารถหมักกลูโคส และสามารถแอสซิมิเลตแอล-ซอร์โบส และมีฟีโนไทป์แตกต่างจากสายพันธุ์ EM 64 คือ สามารถแอสซิมิเลตแอลฟา-ทรีฮาโลส แอสซิมิเลตเมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์ แอสซิมิเลตเมเลไซโทส แอสซิมิเลตไรบิทอล และดี-กลูโคโน-1,5-แลกโตน ไม่สามารถแอสซิมิเลตไนเตรต สามารถเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์ และบนอาหารที่มีกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์

2. *Candida tratensis* sp. nov. (EM 9)

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ EM 9 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida* sp. YS55 โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 7 นิวคลีโอไทด์ใน 504 นิวคลีโอไทด์ หรือเท่ากับ 1.38 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเทียบกับ type strain ของ *Candida maltosa* NRRL Y-17677 ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกับ EM 9 เป็นอันดับสอง พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 8 นิวคลีโอไทด์ใน 504 นิวคลีโอไทด์ หรือเท่ากับ 1.58 เปอร์เซ็นต์ จากความแตกต่างของลำดับเบสแสดงว่าเป็นคนละสปีชีส์กับทั้ง *Candida* sp. YS55 และ *C. maltosa* NRRL Y-17677 ซึ่งเมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA พบว่าสายพันธุ์ EM 9 cluster กับ *Candida* sp. YS55, *Candida* sp. YS53 และ *C. maltosa* NRRL Y-17677 (ภาพที่ 6)

สายพันธุ์ EM 9 มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว สร้างเส้นใยเทียม ไม่สร้างแอสโคสปอร์ หมักกลูโคส ไม่แอสซิมิเลตไนเตรต ไม่ทำปฏิกิริยากับสปีโดอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Candida* จึงจัดจำแนกสายพันธุ์ EM 9 เป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Candida* โดยตั้งชื่อว่า *Candida tratensis* sp. nov. เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างเปลือกไม้ผุที่เก็บจากป่าชายเลน บ้านตรอกแซง อ.เมือง จ.ตราด และมี EM 9 เป็น type strain



ภาพที่ 6 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส EM 9 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

ลักษณะของ *Candida tratensis* sp. nov. (EM 9)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายชั่ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์รูปร่างค่อนข้างกลม มีขนาด (1.1)-(1.9) x (1.1)-(1.9) ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นกลุ่ม เซลล์ตกตะกอนที่ก้นหลอด

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม ผิวมัน ขอบมีลักษณะโค้ง/เว้าเล็กน้อย

Dalmau plate culture บนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar พบว่าสร้างเส้นใยเทียม

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์-	

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	อินนูลิน	-
กาแลกโทส	+	โซลูเบิลสตาร์ช	+
แอล-ซอร์บิต	+	กลีเซอรอล	+
ดี-ไรโบส	+	อีรีทริทอล	-
ดี-ไซโลส	+	ไรบิทอล	+

แอล-อะราบีโนส	+	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-อะราบีโนส	-	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-แรมโนส	-	กาแลกทิทอล	-
ซูโครส	+	ไมโอ-อินโนซิทอล	-
มอลโทส	+	ดี-กลูโคโน-1, 5-แลกโทน	+
แอลฟา-ทรีฮาโลส	+	กรด 2-คีโทกลูโคนิก	+
เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	+	กรด 5-คีโทกลูโคนิก	+
เซลโลไบโอส	+	ดี-กลูคูโรเนต	-
ซาลิซิน	-	กรดดี-กาแลกทูโรนิก	-
เมลิไบโอส	-	ดีแอล-แลกเทต	+
แลกโทส	-	ซักซิเนต	+
ราฟฟิโนส	-	ซิเตรต	+
เมเลไซโทส	+	เอทานอล	+

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	+	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+
ไนไตรต์	-	คาตาเวอริน	+
เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+		

ลักษณะอื่นๆ:

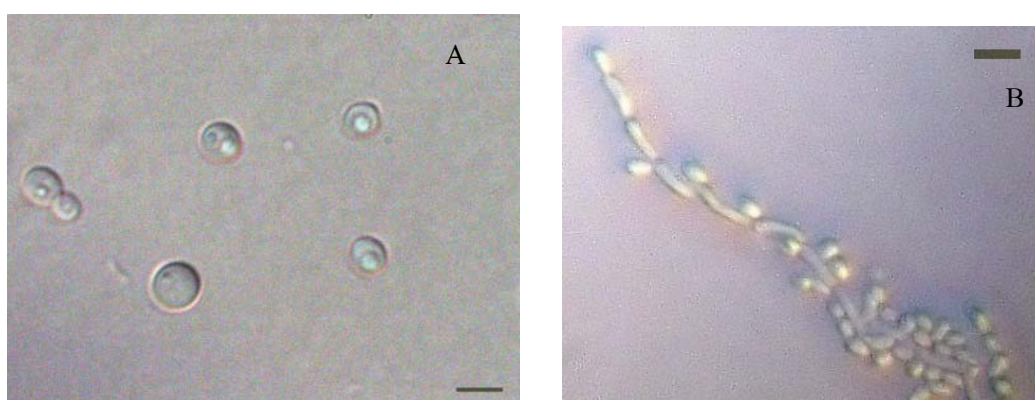
การเจริญที่ 25 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	+
การเจริญที่ 30 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	+
การเจริญที่ 35 °C	+	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	+
การเจริญที่ 37 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	+
การเจริญที่ 42 °C	-	การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะซิเนมบลูปี	-
การเจริญที่ 45 °C	-	การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ

C. tratensis sp. nov. มีฟีโนไทป์ที่แตกต่างจาก *C. maltosa* NRRL Y-17677 คือ ไม่สามารถหมักซูโครส และทรีฮาโลส สามารถแอสซิมิลेट์-ไรโบส แอสซิมิลेट์โซลูเบิลสตาร์ช และแอล-อะราบิโนส สามารถเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารเหลวที่มี โซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 7 แสดงสัณฐานวิทยาของ *Candida tratensis* sp. nov.

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

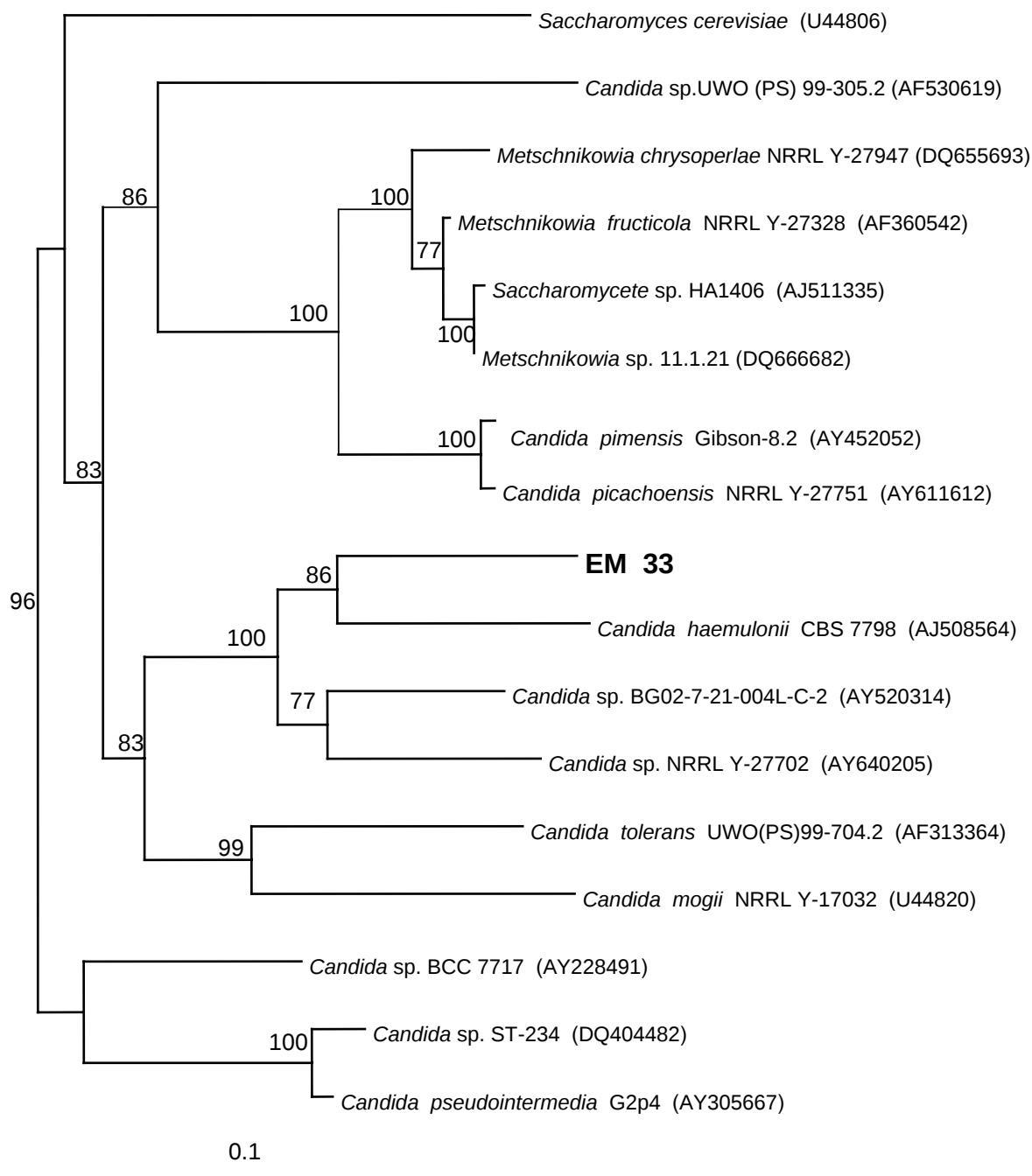
(B) เส้นใยเทียมที่สร้างขึ้นบนอาหาร Potato Dextrose Agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 2.5 ไมโครเมตร)

3. *Candida chanthaburiensis* sp. nov. (EM 33)

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ EM 33 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida haemulonii* CBS 7798 โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 26 นิวคลีโอไทด์ใน 558 นิวคลีโอไทด์ หรือเท่ากับ 4.65 เปอร์เซ็นต์ ความแตกต่างดังกล่าวแสดงว่า EM 33 เป็นคนละสปีชีส์กับ *C. haemulonii* CBS 7798 ซึ่งเมื่อพิจารณา

จากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA พบว่าสายพันธุ์ EM 33 cluster กับ *C. haemulonii* CBS 7798 และมีตำแหน่งที่ค่อนข้างห่างกัน (ภาพที่ 8)

สายพันธุ์ EM 33 พบว่ามีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว ไม่สร้างเส้นใย ไม่สร้าง แอสโคสปอร์ หมักกลูโคส ไม่แอสซิมิเลตไนเตรต ไม่ทำปฏิกิริยากับสไลโดอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Candida* ดังนั้นจึงเสนอว่าสายพันธุ์ EM 33 เป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida chanthaburiensis* sp. nov. เนื่องจาก แยกได้จากตัวอย่างโองกางใบเล็กที่เก็บจากป่าชายเลนในบริเวณศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี และมี EM 33 เป็น type strain



ภาพที่ 8 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส EM 33 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

ลักษณะของ *Candida chanthaburiensis* sp. nov. (EM 33)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์รูปร่างกลม มีขนาด (0.8)-(1.8) x (0.8)-(1.8) ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็น กลุ่ม พบเซลล์ทั่วหลอดและมีฝ้าที่ขอบหลอด

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า โคโลนีมีสีครีม ผิวมัน ขอบเรียบ

Dalmau plate culture บนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar ไม่พบการสร้างเส้นใย เทียมและเส้นใยแท้

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	+
มอลโทส	-	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	อินนูลิน	-
กาแลกโทส	+	โซลูเบลิสตาร์ช	+
แอล-ซอร์โบส	+	กลีเซอรอล	+
ดี-ไรโบส	+	อีริทริทอล	-

ดี-ไซโลส	+	ไบริบิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	+	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-อะราบิโนส	-	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-แรมโนส	+	กาแลกทิทอล	+
ซูโครส	+	ไมโอ-อินโนซิทอล	-
มอลโทส	+	ดี-กลูโคโน-1, 5-แลกโทน	+
แอลฟา-ทรีฮาโลส	+	กรด 2-คีโทกลูโคนิก	+
เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-	กรด 5-คีโทกลูโคนิก	-
เซลโลไบโอส	-	ดี-กลูคูโรเนต	-
ซาลิซิน	+	กรดดี-กาแลกทูโรนิก	-
เมลิไบโอส	-	ดีแอล-แลกเทต	+
แลกโทส	-	ซักซิเนต	+
ราฟฟิโนส	+	ซิเตรต	+
เมลไซโทส	+	เอทานอล	+

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	-	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+
ไนไตรต์	-	คาตาเวอริน	+
เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+		

ลักษณะอื่นๆ:

การเจริญที่ 25 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	+
การเจริญที่ 30 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	+
การเจริญที่ 35 °C	+	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	-
การเจริญที่ 37 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	-
การเจริญที่ 42 °C	-	การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะซิเนมบลูปี	-
การเจริญที่ 45 °C	-	การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ

C. chanthaburiensis sp. nov. มีฟีโนไทป์ที่แตกต่างจาก *C. haemulonii* CBS 7798 คือ ไม่สามารถหมักซูโครส สามารถแอสซิมิเลตแอลกอฮอล์-ซอร์โบส แอสซิมิเลตซาลิซิน และดีแอล-แลกเทต สามารถแอสซิมิเลตเอทิลลามีโนไฮโดรคลอไรด์ ไม่สามารถเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส ไม่สร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ สามารถเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์ และบนอาหารที่มีกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์

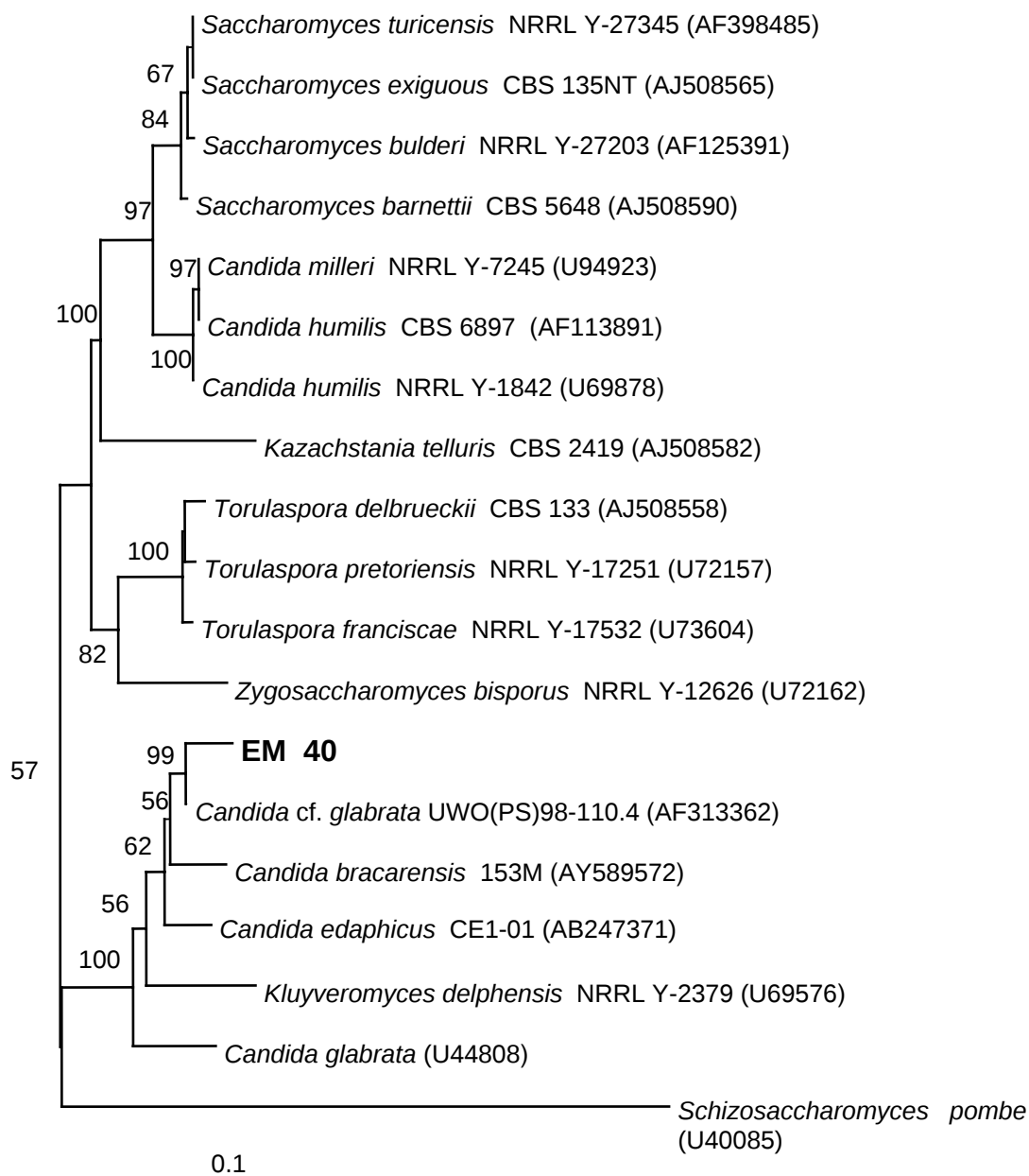


ภาพที่ 9 แสดงลักษณะวิทยาของเซลล์ของ *Candida chanthaburiensis* sp. nov. ที่เลี้ยงในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 5 ไมโครเมตร)

4. *Candida kungkrabaenensis* sp. nov. (EM 40)

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ EM 40 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida* cf. *glabrata* UW (PS) 98-110.4 โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 10 นิวคลีโอไทด์ใน 590 นิวคลีโอไทด์ หรือเท่ากับ 1.68 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงถือว่า EM 40 เป็นคนละสปีชีส์กับ *C. cf. glabrata* Uw (PS) 98-110.4 ซึ่งเมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA พบว่าสายพันธุ์ EM 40 cluster กับ *C. cf. glabrata* UW (PS) 98-110.4, *C. braccarensis* 153M, *C. edaphicus* CE1-01, *Kluyveromyces delphensis* NRRL Y-2379 และ *C. glabrata* (ภาพที่ 10)

สายพันธุ์ EM 40 พบว่ามีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว ไม่สร้างเส้นใย ไม่สร้างแอสโคสปอร์ ไม่แอสซิมิเลตไนเตรต ไม่ทำปฏิกิริยากับสปีโดอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Candida* ดังนั้นจึงเสนอสายพันธุ์ EM 40 เป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida kungkrabaenensis* sp. nov. เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างกิ่งไม้แห้งที่เก็บจากป่าชายเลนในบริเวณศูนย์การศึกษาการพัฒนาอ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี และมี EM 40 เป็น type strain



ภาพที่ 10 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส EM 40 และสปีชีส์ที่มี

ความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

ลักษณะของ *Candida kungkrabaenensis* sp. nov. (EM 40)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์รูปร่างรี มีขนาด (0.7)-(1.2) x (1.2)-(1.6) ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม เซลล์ตกตะกอนที่ก้นหลอด

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า โคโลนีมีสีครีม ผิวมัน ขอบมีลักษณะโค้ง/เว้าเล็กน้อย

Dalmau plate culture บนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar ไม่พบการสร้างเส้นใย เทียมและเส้นใยแท้

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	+
มอลโทส	-	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	อินนูลิน	-
กาแลกโทส	-	โซลูเบลิสตาร์ช	+
แอล-ซอร์บอส	-	อีรีทริทอล	-
ดี-ไซโลส	+	ไรบิทอล	-

แอล-อะราบีโนส	+	ดี-กลูซิทอล	-
ดี-อะราบีโนส	+	ดี-แมนนิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	กาแลกทิทอล	-
ซูโครส	+	ไมโอ-อินโนซิทอล	-
มอลโทส	+	ดี-กลูโคโน-1, 5-แลกโทน	-
แอลฟา-ทรีฮาโลส	+	กรด 2-คีโทกลูโคนิก	-
เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-	กรด 5-คีโทกลูโคนิก	-
เซลโลไบโอส	-	ดี-กลูคูโรเนต	-
ซาลิซิน	-	กรดดี-กาแล็กทูโรนิก	-
เมลิไบโอส	-	ดีแอล-แลกเทต	+
แลกโทส	-	ซัคซิเนต	+
ราฟไฟโนส	-	ซิเตรต	-
เมเลไซโทส	+	เอทานอล	+

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	-	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+
ไนไตรต์	-	คาตาเวอริน	-
เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	-		

ลักษณะอื่นๆ:

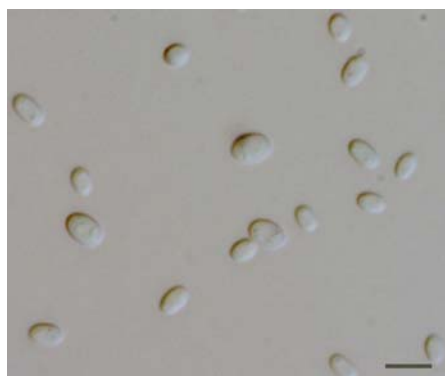
การเจริญที่ 25 ⁰ C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	+
การเจริญที่ 30 ⁰ C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	+
การเจริญที่ 35 ⁰ C	+	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	+
การเจริญที่ 37 ⁰ C	+	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	+
การเจริญที่ 42 ⁰ C	+	การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะซิเนมบลูปี	-
การเจริญที่ 45 ⁰ C	-	การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ

Candida kungkrabaenensis sp. nov. มีฟีโนไทป์ที่แตกต่างจาก *C. cf. glabrata* คือ สามารถแอสซิมิเลตดี-ไซโลส แอสซิมิเลตแอล-อะราบิโนส แอสซิมิเลตดี-อะราบิโนส แอสซิมิเลตซูโครส แอสซิมิเลตมอลโทส แอสซิมิเลตทรีฮาโลส แอสซิมิเลตเมลไโซโทส แอสซิมิเลตโซลูเบิลสตาร์ช และซัคซินต สามารถเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์

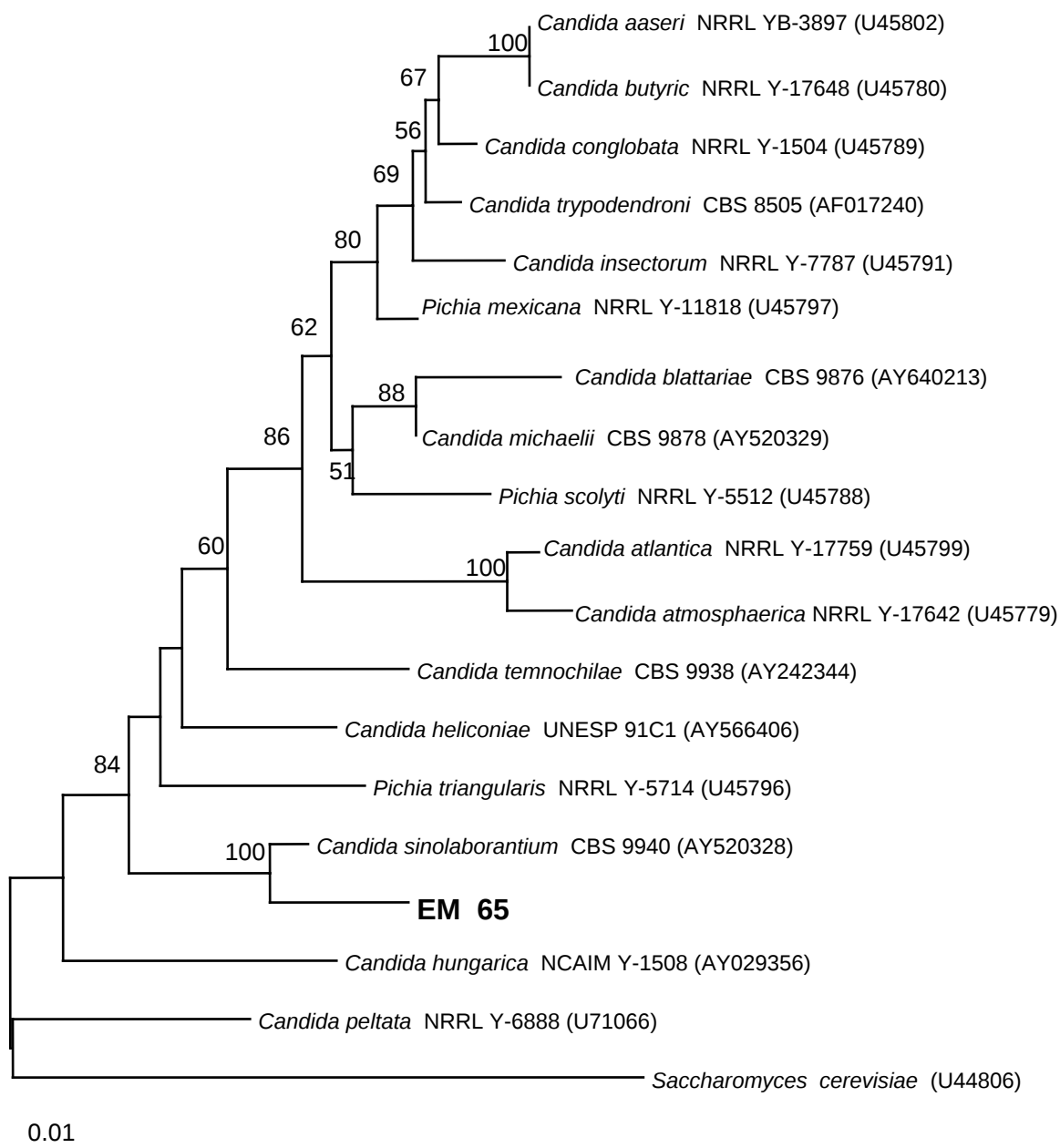


ภาพที่ 11 แสดงลักษณะวิทยาของเซลล์ของ *Candida kungkrabaenensis* sp. nov. ที่เลี้ยงในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 5 ไมโครเมตร)

5. *Candida rayongensis* sp. nov. (EM 65)

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ EM 65 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida sinolaborantium* CBS 9940 โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 12 นิวคลีโอไทด์ใน 515 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA หรือเท่ากับ 1.68 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงถือว่าเป็นคนละสปีชีส์กับ *C. sinolaborantium* CBS 9940 ซึ่งเมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA พบว่าสายพันธุ์ EM 65 cluster กับ *C. sinolaborantium* CBS 9940 ในตำแหน่งที่ห่างจากกันพอสมควร (ภาพที่ 12)

สายพันธุ์ EM 65 พบว่ามีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว ไม่สร้างเส้นใย ไม่สร้าง
 แอสโคสปอร์ ไม่แอสซิมิเลตไนเตรต ไม่ทำปฏิกิริยากับสปีโดอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้าง
 เอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Candida* ดังนั้นจึงเสนอว่าสายพันธุ์ EM 65 เป็น
 สปีชีส์ใหม่ของสกุล *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida rayongensis* sp. nov. เนื่องจากแยกได้จาก
 ตัวอย่างใบไม้ร่วงที่เก็บจากป่าชายเลน อ. บ้านเพ จ. ระยอง และมี EM 65 เป็น type strain



ภาพที่ 12 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส EM 65 และสปีชีส์ที่มี

ความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

ลักษณะของ *Candida rayongensis* sp. nov. (EM 65)

การสืบพันธุ์แบบไม้อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์รูปร่างรูปไข่ มีขนาด (0.8)-(1.6) x (0.8)-(2.0) ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม เซลล์เจริญทั่วหลอดและมีฝ้าที่ขอบหลอดอาหาร

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม ผิวด้าน ขอบหยักไม่สม่ำเสมอ

Dalmau plate culture บนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar ไม่พบการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	-	แลกโทส	-
กาแลกโทส	+	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	+	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	อินนูลิน	+
กาแลกโทส	+	โซลูเบลิสตาร์ช	+
แอล-ซอร์โบส	+	กลีเซอรอล	+
ดี-ไรโบส	+	อีริทริทอล	+

ดี-ไซโลส	+	ไบริบิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	+	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-อะราบิโนส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-แรมโนส	-	กาแลกทิทอล	+
ซูโครส	+	ไมโอ-อินโนซิทอล	-
มอลโทส	+	ดี-กลูโคโน-1, 5-แลกโทน	+
แอลฟา-ทรีฮาโลส	+	ดี-กลูคูโรเนต	-
เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	+	กรดดี-กาแลกทูโรนิก	-
เซลโลไบโอส	+	ดีแอล- แลกเทต	-
ซาลิซิน	+	ซัคซิเนต	+
เมลิไบโอส	-	ซีเตรต	+
แลกโทส	-	เอทานอล	-
ราฟฟิโนส	-		
เมลไซโทส	+		

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	-	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+
ไนไตรต์	+	คาตาเวอริน	+
เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+		

ลักษณะอื่นๆ:

การเจริญที่ 25 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	+
การเจริญที่ 30 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	+
การเจริญที่ 35 °C	+	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	+
การเจริญที่ 37 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	+
การเจริญที่ 42 °C	-	การทำปฏิกิริยากับสไลโคอะซิเนมบลูปี	-
การเจริญที่ 45 °C	-	การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ



ภาพที่ 13 แสดงลักษณะวิทยาของเซลล์ของ *Candida rayongensis* sp. nov. ที่เลี้ยงในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 5 ไมโครเมตร)

6. *Pichia prachuapensis* sp. nov. (SM 4)

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ SM 4 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Pichia anomala* VTT C-04565 โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 20 นิวคลีโอไทด์ใน 573 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA หรือเท่ากับ 3.84 เปอร์เซ็นต์ จากความแตกต่างของลำดับเบสแสดงว่าเป็นคนละสปีชีส์กับ *P. anomala* VTT C-04565 และเมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการพบว่า SM 4 cluster กับ *Pichia* หลายสปีชีส์ และสกุล *Candida* แต่มีระยะห่างค่อนข้างมาก (ภาพที่ 14)

สายพันธุ์ SM 4 พบว่ามีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว สร้างแอสโคสปอร์ที่มีรูปหมวก จำนวน 2-4 สปอร์ในแอสค์รูปรางกลม ไม่ทำปฏิกิริยากับสไปโดอะซิเนมบลูปี และไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Pichia* ดังนั้นจึงจัดจำแนก SM 4 เป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Pichia* โดยตั้งชื่อว่า *Pichia prachuapensis* sp. nov. เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างใบไม้ร่วงที่เก็บจากป่าชายเลน อ. บางสะพาน จ. ประจวบคีรีขันธ์ และมี SM 4 เป็น type strain

ลักษณะของ *Pichia prachuapensis* sp. nov. (SM 4)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม เซลล์ตกตะกอนที่ก้นหลอดและมีฝ้าที่ขอบหลอดอาหาร

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม ผิวด้าน ขอบเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าสร้างแอสโคสปอร์ที่มีรูปหมวก จำนวน 2-4 สปอร์ในแอสคัสรูปร่างกลม

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	+	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	+	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	+	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-

การใช้สารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	เมลิไบโอส	-
กาแลกโทส	+	แลกโทส	-
แอล-ซอร์บิต	+	เมเลไซโทส	+
ดี-ไรโบส	+	อีริทริทอล	+
ดี-ไซโลส	-	ไบริทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	ดี-กลูซิทอล	+

ดี-อะราบิโนส	-	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-1,5-แลกโตน	+
ซูโครส	+	กรด 2-คีโทกลูโคนิก	-
มอลโทส	+	ดี-กลูโคเนต	+
แอลฟา-ทรีฮาโลส	+	ดีแอล-แลกเทต	+
เซลโลไบโอส	+	ซักซิเนต	+
ซาลิซิน	+	ซิเตรต	+
ราฟฟิโนส	-	ดี-กลูคูโรเนต	-
อินอซิทอล	-	กรดดี-กาแล็กทูโรนิก	-

การใช้สารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	+	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
ไนไตรต์	+	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+

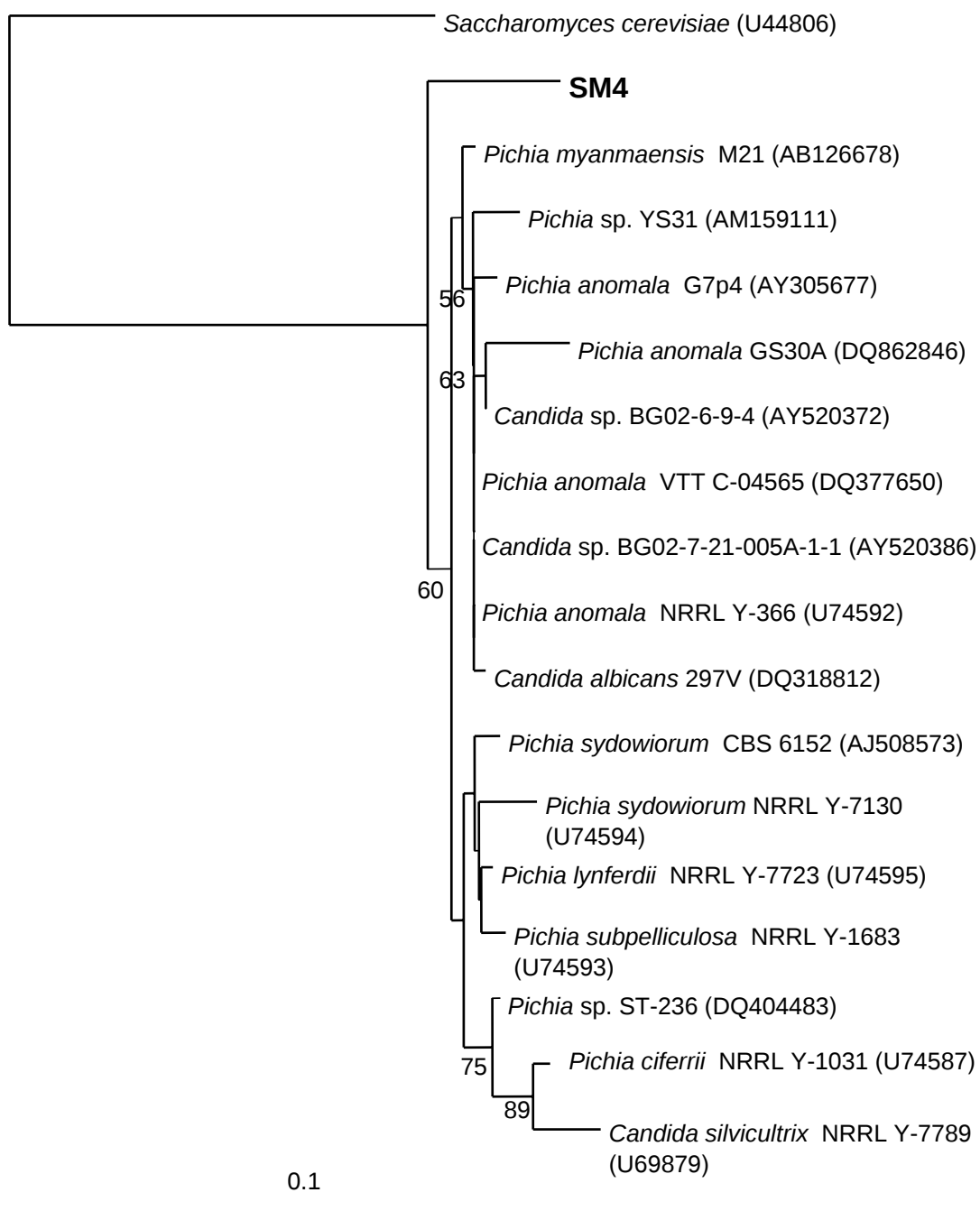
ลักษณะอื่นๆ:

การเจริญที่ 25 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	+
การเจริญที่ 37 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	+
การเจริญที่ 42 °C	+	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	+
การเจริญที่ 45 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	+
การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-		
การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะซิเนียมบลูปี	-		
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+		

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ



ภาพที่ 14 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส SM 4 และสปีชีส์ที่มี

ความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA

(ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

P. prachuapensis sp. nov. มีฟีโนไทป์ที่แตกต่างจาก *P. anomala* คือ สามารถแอสซิมิเลตซอร์โบส และไม่สามารถแอสซิมิเลตราฟิโนส

7. *Candida bangsaphanensis* sp. nov. (SM 6)

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ SM 6 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida silvae* G 126 โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 9 นิวคลีโอไทด์ใน 445 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA หรือเท่ากับ 2.02 เปอร์เซ็นต์ จากความแตกต่างของลำดับเบสแสดงว่าเป็นคนละสปีชีส์กับ *C. silvae* G126 และเมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการพบว่า SM 6 cluster กับ *C. silvae* G 126 และ *C. silvae* NRRL Y-6725 (ภาพที่ 15)

สายพันธุ์ SM 6 พบว่ามีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว ไม่แอสซิมิเลตไนเตรต ไม่สร้างแอสโคสปอร์ ไม่ทำปฏิกิริยากับสปีดอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนก SM 6 เป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Candida* โดยตั้งชื่อว่า *Candida bangsaphanensis* sp. nov. เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างใบไม้ร่วงที่เก็บจากป่าชายเลน อ. บางสะพาน จ. ประจวบคีรีขันธ์ และมี SM 6 เป็น type strain

ลักษณะของ *Candida bangsaphanensis* sp. nov. (SM 6)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างค่อนข้างรี อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม เซลล์เจริญทั่วหลอดและมีฝ้าที่ขอบหลอดอาหาร

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม ผิวมัน ขอบเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-

การใช้สารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	เมลิไบโอส	-
กาแลกโทส	-	แลกโทส	-
แอล-ซอร์โบส	+	เมเลไซโทส	-
ดี-ไรโบส	+	อีริทริทอล	-
ดี-ไซโลส	-	ไรบิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-อะราบิโนส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-เรมโนส	-	ดี-กลูโคน-1,5-แลกโทน	+
ซูโครส	+	กรด 2-คีโทกลูโคนิก	-
มอลโทส	-	ดี-กลูโคนต	+
แอลฟา-ทรีฮาโลส	-	ดีแอล-แลกเทต	+
เซลโลไบโอส	-	ซัคซินต	+
ซาลิซิน	-	ซีเตรต	+
ราฟฟิโนส	-	ดี-กลูคูโรนต	-
อินอซิทอล	-	กรดดี-กาแล็กทูโรนิก	-

การใช้สารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	-	เอทิลลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
ไนไตรต์	-	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+

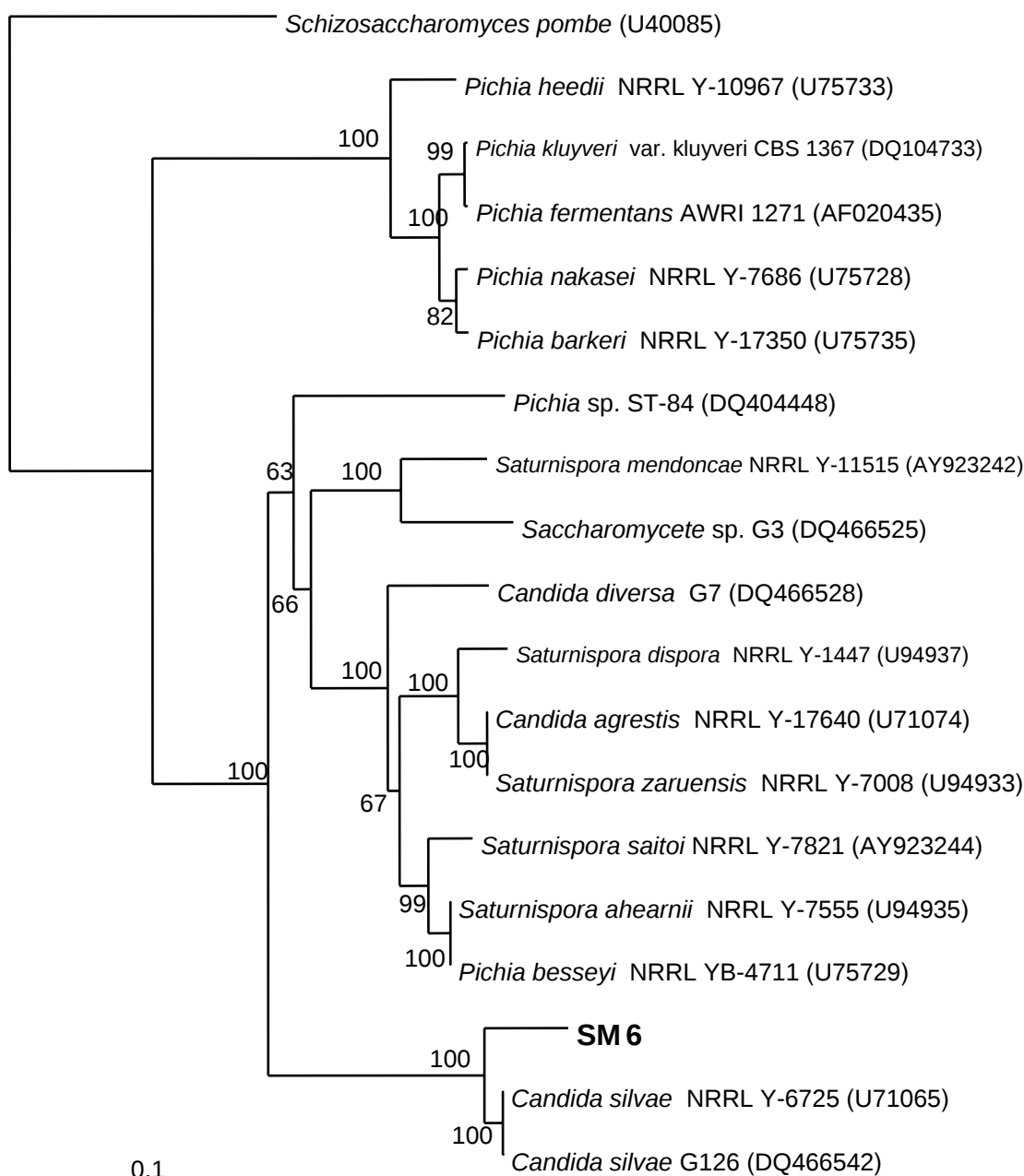
ลักษณะอื่นๆ:

การเจริญที่ 25 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	+
การเจริญที่ 37 °C	-	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	-
การเจริญที่ 42 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	+
การเจริญที่ 45 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	+
การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-		
การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะซิเนียมบลูปี	-		
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	-		

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ



ภาพที่ 15 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส SM 6 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

C. bangsaphanensis sp. nov. มีฟีโนไทป์ที่แตกต่างจาก *C. silvae* คือ สามารถแอสซิมิเลตแอล-ซอร์โบส ไรโบส ดี-อะราบินอส ซูโครส สามารถเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเจริญในอาหารเหลวโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์

8. *Candida phetchaburiensis* sp. nov. (SM 16)

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ SM 16 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida tropicalis* GS38A โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 20 นิวคลีโอไทด์ใน 476 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA หรือเท่ากับ 4.20 เปอร์เซ็นต์ จากความแตกต่างของลำดับเบสแสดงว่าเป็นคนละสปีชีส์กับ *C. tropicalis* GS38A และเมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการพบว่า SM 16 cluster กับ *Candida* หลายสปีชีส์รวมทั้ง *C. tropicalis* GS38A (ภาพที่ 16)

สายพันธุ์ SM 16 พบว่ามีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว ไม่แอสซิมิเลตในเตรด ไม่สร้างแอสโคสปอร์ ไม่ทำปฏิกิริยากับสไคอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนก SM 16 เป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Candida* โดยตั้งชื่อว่า *Candida phetchaburiensis* sp. nov. เนื่องจากแยกได้จากตัวอย่างใบไม้ร่วงที่เก็บจากป่าชายเลน หาดแหลมหลวง อ. บ้านแหลม จ. เพชรบุรี และมี SM 16 เป็น type strain

ลักษณะของ *Candida phetchaburiensis* sp. nov. (SM 16)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างค่อนข้างกลม อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม เซลล์เจริญที่ก้นหลอด

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม ผิวด้าน ขอบเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	+	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	+	ทรีฮาโลส	+
มอลโทส	+	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-

การใช้สารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	เมลิไบโอส	-
กาแลกโทส	+	แลกโทส	-
แอล-ซอร์โบส	+	เมเลไซโทส	+
ดี-ไรโบส	+	อีริทริทอล	-
ดี-ไซโลส	+	ไรบิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-อะราบิโนส	-	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-เรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-1,5-แลกโทน	+
ซูโครส	+	กรด 2-คีโทกลูโคนิก	-
มอลโทส	+	ดี-กลูโคนต	+
แอลฟา-ทรีฮาโลส	+	ดีแอล-แลกเทต	+
เซลโลไบโอส	+	ซัคซินต	+
ซาลิซิน	+	ซิเตรต	+
ราฟฟิโนส	-	ดี-กลูคูโรนต	-
อินอซิทอล	-	กรดดี-กาแล็กทูโรนิก	-

การใช้สารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
ไนไตรต์	+	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	-

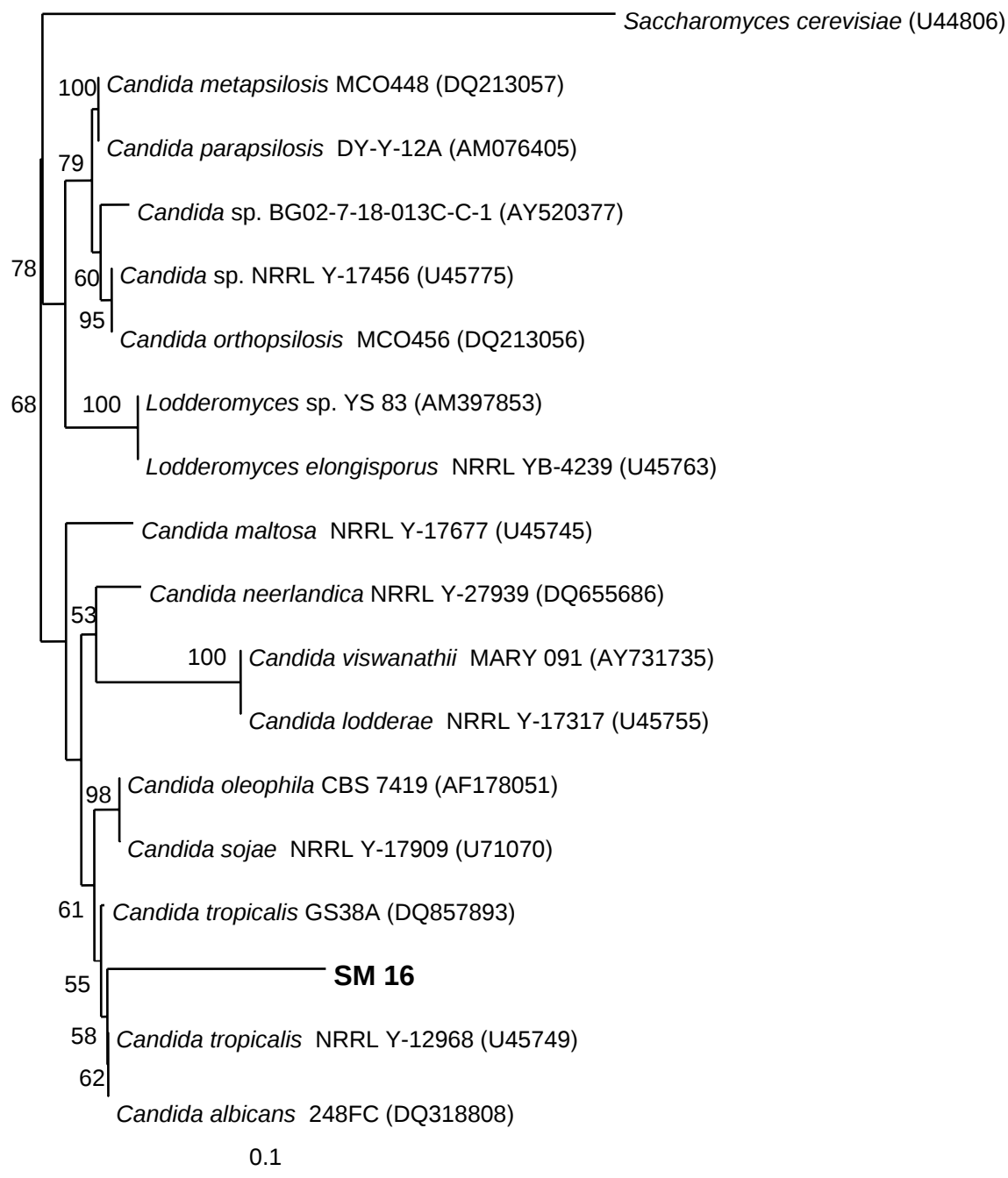
ลักษณะอื่นๆ:

การเจริญที่ 25 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	+
การเจริญที่ 37 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	+
การเจริญที่ 42 °C	+	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	+
การเจริญที่ 45 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	+
การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-		
การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะซิเนียมบลูปี	-		
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+		

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ



ภาพที่ 16 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส SM 16 และสปีชีส์ที่มี

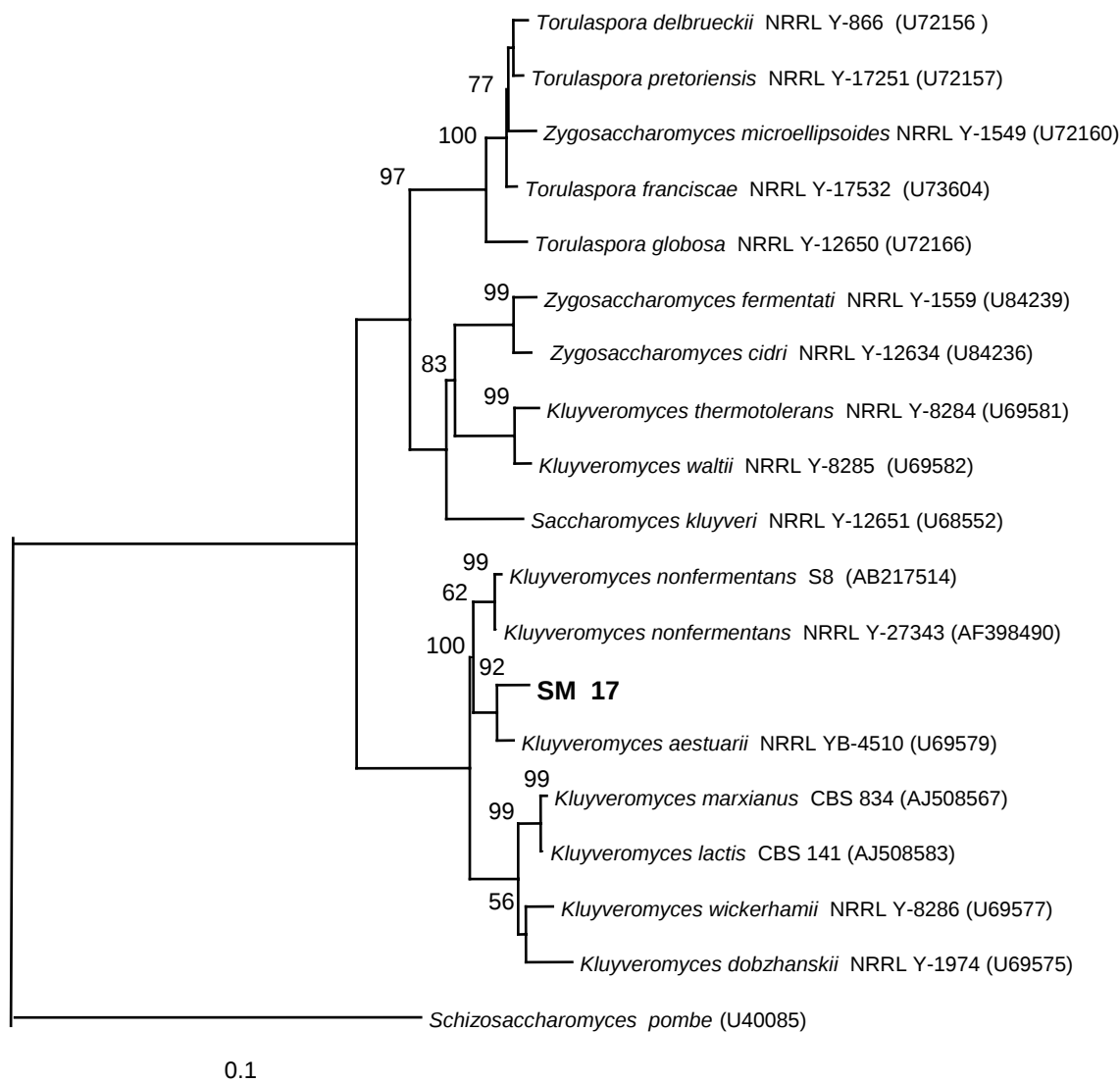
ความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

C. phetchaburiensis sp. nov. มีฟีโนไทป์ที่แตกต่างจาก *C. tropicalis* คือ สามารถแอสซิมิเลตไนโตรเจนได้ ไม่แอสซิมิเลตกรด 2-คีโตกลูโคนิก และแอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์

9. *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (SM 17)

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ SM 17 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Kluyveromyces nonfermentans* S8 โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 10 นิวคลีโอไทด์ใน 556 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA หรือเท่ากับ 1.79 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงถือว่าเป็นคนละสปีชีส์กับ *K. nonfermentans* S8 ซึ่งพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA พบว่าสายพันธุ์ SM 17 cluster กับ *K. nonfermentans* S8 (ภาพที่ 17)

สายพันธุ์ SM 17 พบว่ามีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว ไม่สร้างเส้นใย สร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลม ผนังเรียบ จำนวน 4 สปอร์ในแอสกัสรูปร่างกลม ไม่แอสซิมิเลตไนโตรเจน ไม่ทำปฏิกิริยากับสปีโดอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Kluyveromyces* ดังนั้นจึงเสนอว่า SM 17 เป็นสปีชีส์ใหม่และตั้งชื่อเป็น *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. โดยมีสายพันธุ์ SM 17 เป็น type strain การตั้งชื่อสปีชีส์ว่า “siamensis” เนื่องจาก type strain แยกได้จากใบไม้ร่วงที่หาดปึกเตียน อ. ท่ายาง จ. เพชรบุรี ในประเทศไทย



ภาพที่ 17 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส SM 17 และสปีชีส์ที่มี

ความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

ลักษณะของ *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. (SM 17)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์รูปร่างรูปไข่ มีขนาด (0.8)-(1.5) x (1.0)-(1.8) ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือ เป็นกลุ่ม เซลล์ตกตะกอนที่ก้นหลอด

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า โคโลนีมีสีครีม ผิวด้าน ขอบมีลักษณะโค้ง/เว้าเล็กน้อย

Dalman plate culture บนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar ไม่พบการสร้างเส้นใย เทียมและเส้นใยแท้

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าสร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลม ผนังเรียบ จำนวน 2-4 สปอร์ในแอสคัสรูปร่างกลม

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-

การแอสซิมิลเลตสารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	กลีเซอรอล	+
กาแลกโทส	+	อีริทริทอล	+
แอล-ซอร์บิต	+	ดี-กลูซิทอล	+

ดี-ไริโบส	+	ดี-แมนนิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	กาแลกทิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	ไมโอ-อินโนซิทอล	+
ดี-อะราบิโนส	+	ดี-กลูโคโน-1,5-แลกโตน	+
แอล-เรมโนส	+	ดี-กลูคูโรเนต	+
ซูโครส	+	ดีแอล-แลกเทต	+
มอลโทส	+	ซีเตรต	+
แอลฟา-ทรีฮาโลส	+		
เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	+		
เซลโลไบโอส	+		
ซาลิซิน	+		
เมลิไบโอส	+		
แลกโทส	+		
ราฟฟิโนส	+		
เมเลไซโทส	+		

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	-	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+
ไนไตรต์	-	คาตาเวอริน	+
เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+		

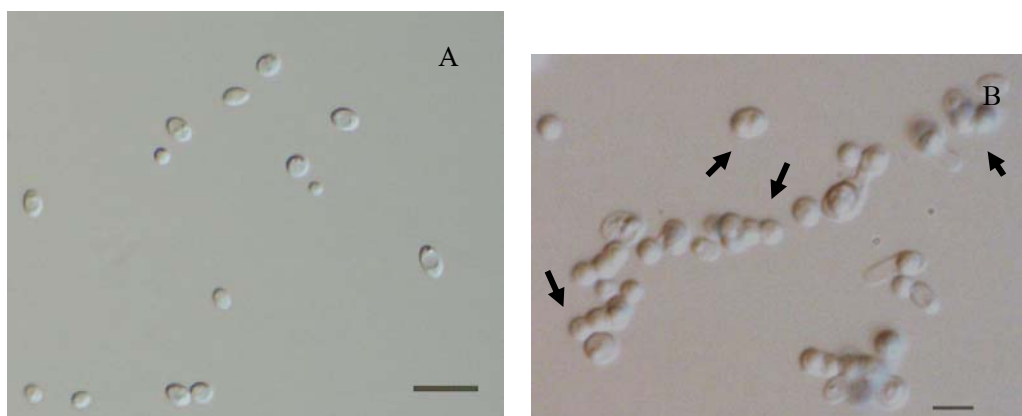
ลักษณะอื่นๆ:

การเจริญที่ 25 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	+
การเจริญที่ 30 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	+
การเจริญที่ 35 °C	+	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	+
การเจริญที่ 37 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	+
การเจริญที่ 42 °C	-	การทำปฏิกิริยากับสไลโคโซเนียบลูปี	-
การเจริญที่ 45 °C	-	การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ



ภาพที่ 18 แสดงลักษณะวิทยาของ *Kluyveromyces siamensis* sp. nov.

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

(B) แอสโคสปอร์รูปร่างกลม ผนังเรียบ จำนวน 2-4 สปอร์ในแอสคัสรูปร่างกลม (ศรีษะ) สร้างบนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 5 ไมโครเมตร)

10. *Debaryomyces chumphonensis* sp. nov. (SM 37)

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ SM 37 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Debaryomyces nepalensis* NRRL Y-7108 โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 28 นิวคลีโอไทด์ใน 508 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA หรือเท่ากับ 5.51 เปอร์เซ็นต์ จากความแตกต่างของลำดับเบสแสดงว่าเป็นคนละสปีชีส์ กับ *D. nepalensis* NRRL Y-7108 และเมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการพบว่า SM 37 cluster กับ *D. nepalensis* NRRL Y-7108, *Candida* sp. BG02-6-6-2-1 และ *D. maramus* CBS 9695 (ภาพที่ 19)

สายพันธุ์ SM 37 มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (multipolar) สร้างแอสโคสปอร์ที่มีรูปร่างกลม จำนวน 1 สปอร์ในแอสคัสรูปร่างกลม ไม่แอซิมิเลตไนเตรต ไม่ทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Debaryomyces* ดังนั้นจึงสามารถจัดจำแนก SM 37 เป็นสกุล *Debaryomyces* และตั้งชื่อเป็น *Debaryomyces chumphonensis* sp. nov. เนื่องจากแยกได้จากใบไม้ร่วงที่อุทยานแห่งชาติคลองเพรา อ. หลังสวน จ. ชุมพร โดยมีสายพันธุ์ SM 37 เป็น type strain

ลักษณะของ *Debaryomyces chumphonensis* sp. nov. (SM 37)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างค่อนข้างรี อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม เซลล์เจริญที่ก้นหลอดและมีฝ้าที่ขอบหลอดอาหาร

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม ผิวด้าน ขอบเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่ 20 องศาเซลเซียส พบว่าสร้างแอสโคสปอร์ที่มีรูปร่างกลม จำนวน 1 สปอร์ในแอสคัสรูปร่างกลม

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	+	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	+	ทรีฮาโลส	+
มอลโทส	+	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-

การใช้สารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	เมลิไบโอส	+
กาแลกโทส	+	แลกโทส	+
แอล-ซอร์โบส	+	เมเลไซโทส	+
ดี-ไรโบส	+	อีริทริทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ไริบิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	+	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-อะราบิโนส	-	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคน-1,5-แลกโตน	+
ซูโครส	+	กรด 2-คีโทกลูโคนิก	-
มอลโทส	+	ดี-กลูโคนต	+
แอลฟา-ทรีฮาโลส	+	ดีแอล-แลกเทต	-
เซลโลไบโอส	+	ซักซิเนต	+
ซาลิซิน	+	ซิเตรต	+
ราฟไฟโนส	+	ดี-กลูคูโรเนต	+
อินอซิทอล	-	กรดดี-กาแล็กทูโรนิก	-

การใช้สารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	-	เอทิลลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
ไนไตรต์	+	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การเจริญที่ 25 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	+
การเจริญที่ 37 °C	-	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	+
การเจริญที่ 42 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	+
การเจริญที่ 45 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	+
การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-		

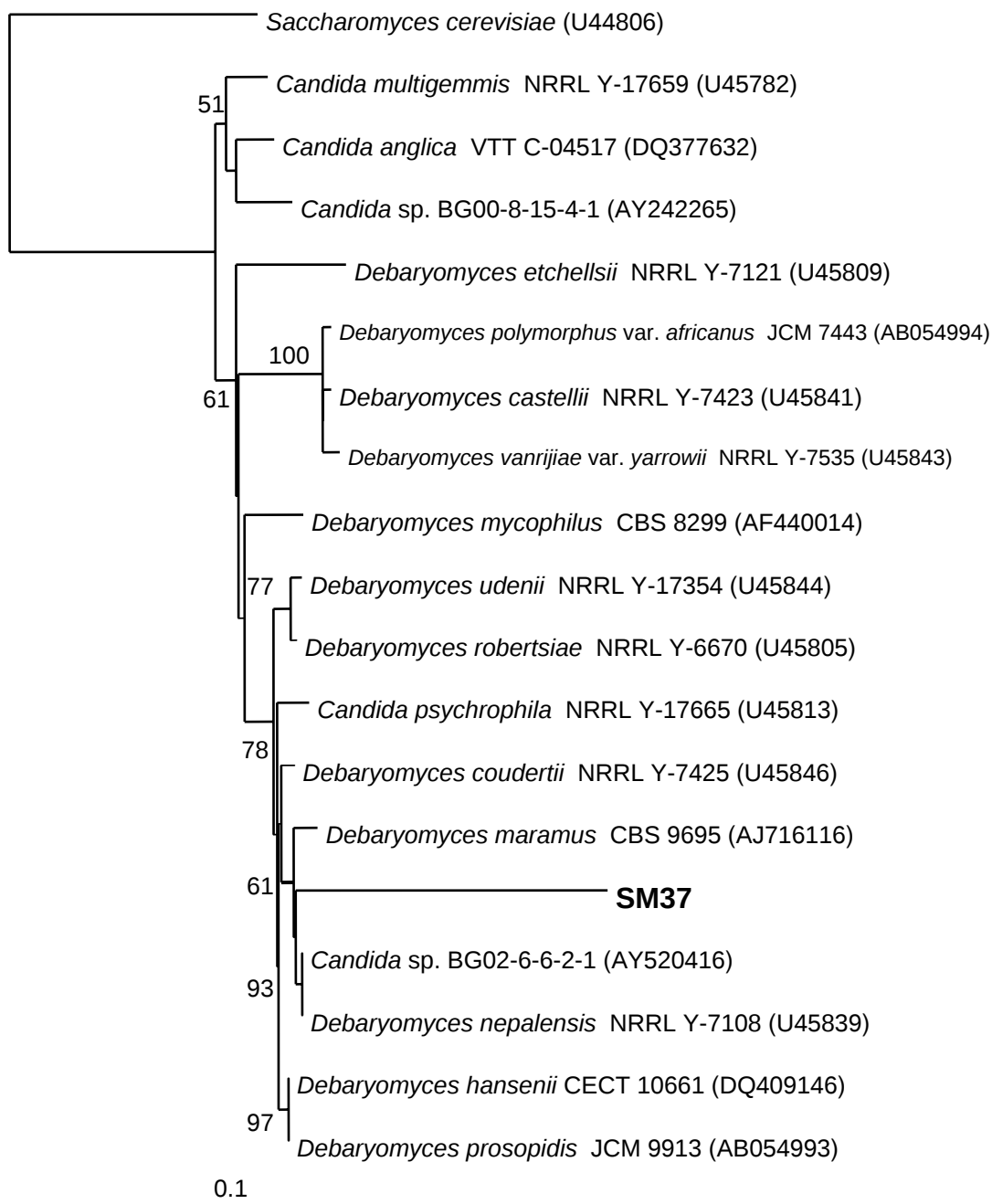
การทำปฏิกิริยากับสีโคอะโซเนียมบลูปี -

การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน -

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ



ภาพที่ 19 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส SM 37 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

D. chumphonensis sp. nov. มีฟีโนไทป์ที่แตกต่างจาก *D. nepalensis* คือ สามารถหมักกาแลกโทส มอลโทส และไม่สามารถแอสซิมิเลตกรด 2-คีโทกลูโคนิก

11. *Candida langsuanensis* sp. nov. (SM 40)

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ SM 40 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida bracarensis* 153M โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 15 นิวคลีโอไทด์ใน 578 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA หรือเท่ากับ 2.59 เปอร์เซ็นต์ จากความแตกต่างของลำดับเบสแสดงว่าเป็นคนละสปีชีส์กับ *C. bracarensis* 153M และเมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการพบว่า SM 40 cluster กับ *C. bracarensis* 153M, *C. cf. glabrata* UWO(PS) 98-110.4, *C. edaphicus* CEI-01 และ *Candida* sp. ST-449 (ภาพที่ 20)

สายพันธุ์ SM 40 พบว่ามีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว ไม่แอสซิมิเลตในเตรด ไม่สร้างแอสโคสปอร์ ไม่ทำปฏิกิริยากับสไปโดอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนก SM 40 เป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida langsuanensis* sp. nov. เนื่องจากแยกได้จากใบไม้ร่วงที่อุทยานแห่งชาติคลองเพรา อ. หลังสวน จ. ชุมพร โดยมีสายพันธุ์ SM 40 เป็น type strain

ลักษณะของ *Candida langsuanensis* sp. nov. (SM 40)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างรี อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม เซลล์เจริญที่ก้นหลอดและมีฝ้าที่ขอบหลอดอาหาร

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม ผิวมัน ขอบเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	+
มอลโทส	-	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-

การใช้สารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	เมลิไบโอส	-
กาแลกโทส	-	แลกโทส	-
แอล-ซอร์โบส	+	เมเลไซโทส	-
ดี-ไรโบส	-	อีริทริทอล	-
ดี-ไซโลส	-	ไรบิทอล	-
แอล-อะราบิโนส	-	ดี-กลูซิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	-	ดี-แมนนิทอล	-
แอล-เรมโนส	-	ดี-กลูโคน-1,5-แลกโตน	+
ซูโครส	-	กรด 2-คีโทกลูโคนิก	-
มอลโทส	-	ดี-กลูโคนต	+
แอลฟา-ทรีฮาโลส	+	ดีแอล-แลกเทต	+
เซลโลไบโอส	-	ซัคซินต	-
ซาลิซิน	-	ซีเตรต	-
ราฟฟิโนส	-	ดี-กลูคูโรนต	-
อินอซิทอล	-	กรดดี-กาแล็กทูโรนิก	-

การใช้สารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	-
ไนไตรต์	-	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+

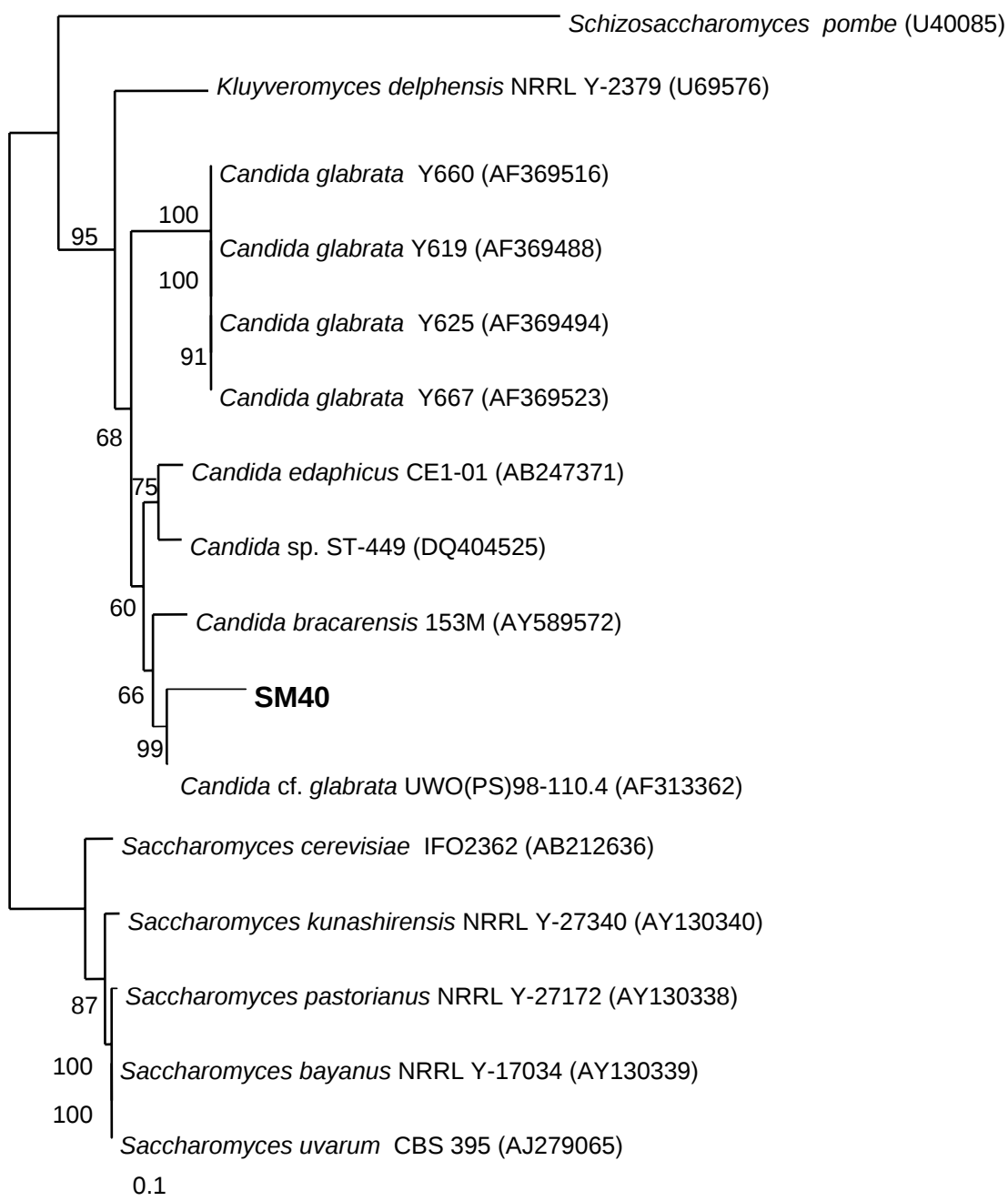
ลักษณะอื่นๆ:

การเจริญที่ 25 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	+
การเจริญที่ 37 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	+
การเจริญที่ 42 °C	+	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	+
การเจริญที่ 45 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	+
การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-		
การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะซิเนียมบลูปี	-		
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	-		

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ



ภาพที่ 20 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส SM 40 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

12. *Candida surathaniensis* sp. nov. (SM 56)

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ SM 56 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida* sp. NRRL Y-27948 โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 15 นิวคลีโอไทด์ใน 598 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA หรือเท่ากับ 2.51 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเทียบกับสปีชีส์ที่มีรายงานแล้วที่ใกล้เคียงที่สุด คือ type strain ของ *Candida melibiosica* NRRL Y-17076 ซึ่งมีลำดับเบสใกล้เคียงกับ SM 56 เป็นอันดับสี่ พบว่าการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 36 นิวคลีโอไทด์ใน 526 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA หรือเท่ากับ 6.84 เปอร์เซ็นต์ จากความแตกต่างของลำดับเบสแสดงว่าเป็นคนละสปีชีส์กับ *Candida* sp. NRRL Y-27948 และ *Candida melibiosica* NRRL Y-17076 เมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการพบว่า SM 56 cluster กับ *Candida* sp. NRRL Y-27948, *Candida* sp. NRRL Y-27950 และ *Candida* sp. ST-211 (ภาพที่ 21)

สายพันธุ์ SM 56 พบว่ามีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว ไม่แอสซิมิเลตในเตรด ไม่สร้างแอสโคสปอร์ ไม่ทำปฏิกิริยากับสไคอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Candida* ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่ของสกุล *Candida* และตั้งชื่อเป็น *Candida surathaniensis* sp. nov. เนื่องจากแยกได้จากใบไม้ร่วงที่ทำทอง อ. กาญจนดิษฐ์ จ. สุราษฎร์ธานี โดยมีสายพันธุ์ SM 56 เป็น type strain

ลักษณะของ *Candida surathaniensis* sp. nov. (SM 56)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างรี อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม เซลล์เจริญทั่วหลอดและมีฝ้าที่ขอบหลอดอาหาร

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม ผิวด้าน ขอบเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	+	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	+	ทรีฮาโลส	+
มอลโทส	-	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-

การใช้สารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	เมลิไบโอส	-
กาแลกโทส	+	แลกโทส	-
แอล-ซอร์โบส	+	เมเลไซโทส	+
ดี-ไรโบส	+	อีริทริทอล	-
ดี-ไซโลส	+	ไรบิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	ดี-กลูซิทอล	+
ดี-อะราบิโนส	+	ดี-แมนนิทอล	+
แอล-เรมโนส	-	ดี-กลูโคน-1,5-แลกโทน	+
ซูโครส	+	กรด 2-คีโทกลูโคนิก	-
มอลโทส	+	ดี-กลูโคนต	+
แอลฟา-ทรีฮาโลส	+	ดีแอล-แลกเทต	-
เซลโลไบโอส	+	ซัคซินต	+
ซาลิซิน	+	ซิเตรต	+
ราฟฟิโนส	+	ดี-กลูคูโรนต	-
อินอซิทอล	-	กรดดี-กาแล็กทูโรนิก	-

การใช้สารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	-	เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+
ไนไตรต์	-	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+

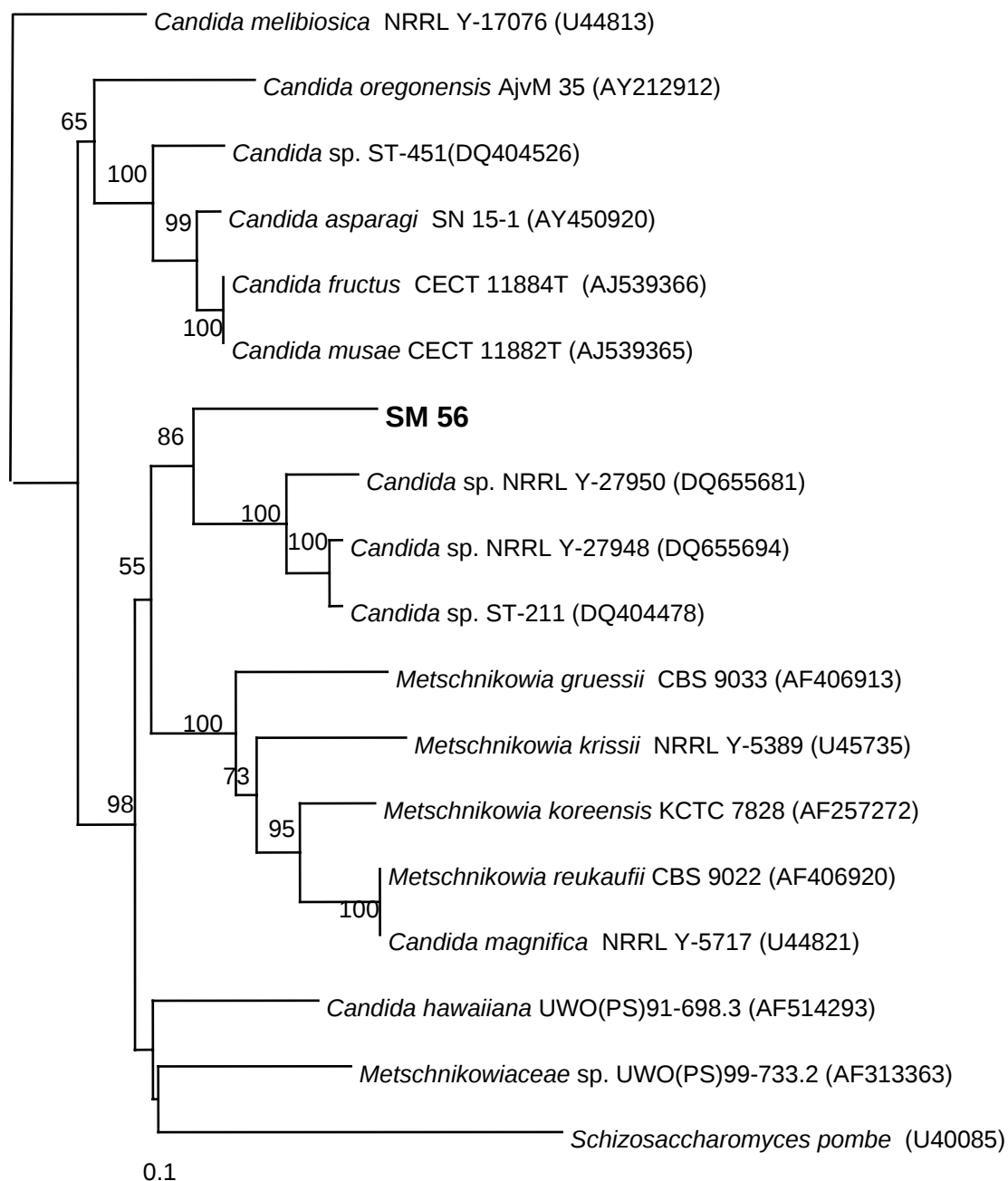
ลักษณะอื่นๆ:

การเจริญที่ 25 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	+
การเจริญที่ 37 °C	-	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	+
การเจริญที่ 42 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	+
การเจริญที่ 45 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	+
การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-		
การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะซิเนียมบลูปี	-		
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+		

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ



ภาพที่ 21 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส SM 56 และสปีชีส์ที่มี

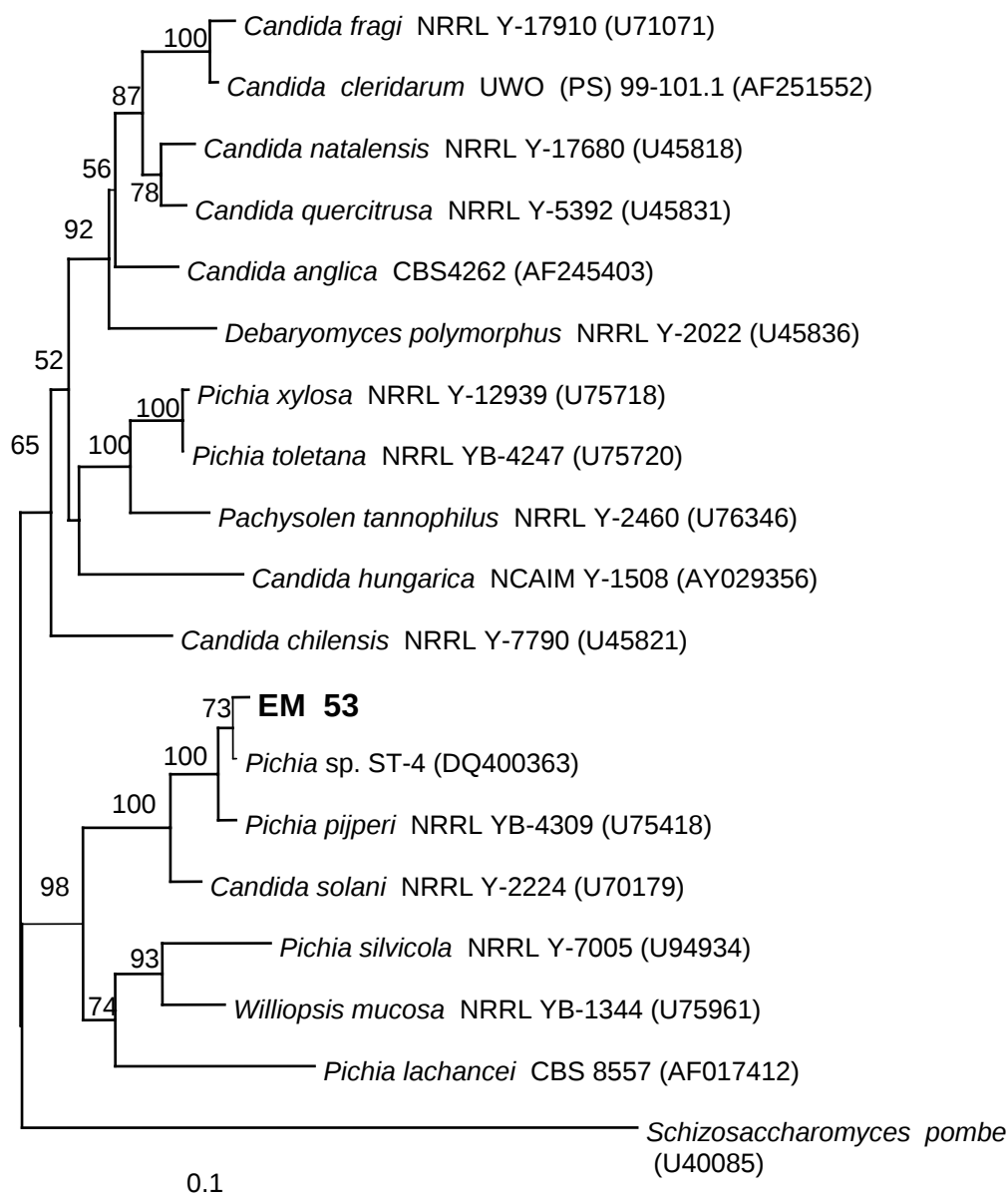
ความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

การจัดจำแนกและการอธิบายลักษณะสายพันธุ์ที่อาจจะเป็นสปีชีส์ใหม่

1. *Candida* sp. EM 53

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ EM 53 กับสปีชีส์ใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Pichia* sp. ST-4 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกจากในประเทศไทยโดยศศิธร จินดาอมรรณ (ศศิธร, 2549) มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 3 นิวคลีโอไทด์ใน 579 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA หรือเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเทียบกับ *P. pijperi* พบว่ามีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 5 นิวคลีโอไทด์ใน 570 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA หรือเท่ากับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาดำแหน่งของ EM 53 ในต้นไม้วิวัฒนาการ พบว่า EM 53 cluster กับ *Pichia* sp. ST-4, *P. pijperi* NRRL YB-4309 และ *Candida solani* NRRL Y-2224 โดยอยู่คนละตำแหน่งกับ *Pichia* sp. ST-4, *P. pijperi* NRRL YB-4309 และ *Candida solani* NRRL Y-2224 (ภาพที่ 22) ดังนั้นจึงอาจจะเป็นคนละสปีชีส์ หรือสปีชีส์เดียวกับเชื้อทั้งสอง ซึ่งจะรู้ได้เมื่อมีการศึกษาเพิ่มเติม

สายพันธุ์ EM 53 พบว่ามีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว ไม่สร้างเส้นใย ไม่สร้างแอสโคสปอร์ ไม่แอสซิมิเลตไนเตรต ไม่ทำปฏิกิริยากับสปีดอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้างเอนไซม์ยูเรียเอส ซึ่งเป็นลักษณะของสกุล *Candida* แต่เนื่องจากยังไม่รู้แน่นอนว่าเป็นสปีชีส์เดียวกันกับ *Pichia* sp. ST-4 และ *P. pijperi* NRRL YB-4309 หรือไม่ ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็น *Candida* sp. EM 53



ภาพที่ 22 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส EM 53 และสปีชีส์ที่มี

ความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA

(ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction

parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน

1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน

evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

ลักษณะของ *Candida* sp. EM 53

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายชั่ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างรี มีขนาด $(0.7)-(1.9) \times (0.7)-(2.0)$ ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็น กลุ่ม เซลล์เจริญทั่วหลอดและมีฝ้าที่ขอบหลอดอาหาร

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า โคโลนิมีสีครีม ผิวด้าน ขอบมีลักษณะหยักไม่สม่ำเสมอ

Dalmau plate culture บนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar ไม่พบการสร้างเส้นใย เทียมและเส้นใยแท้

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	อินนูลิน	-
กาแลกโทส	-	โซลูเบลิสตาร์ช	+
แอล-ซอร์โบส	-	อีรีทริทอล	+
ดี-ไรโบส	-	ไรบิทอล	-

ดี-ไซโลส	-	ดี-กลูซิทอล	+
แอล-อะราบิโนส	-	ดี-แมนนิทอล	+
ดี-อะราบิโนส	-	กาแลกทิทอล	-
แอล-แรมโนส	-	ไมโอ-อินโนซิทอล	-
ซูโครส	+	ดี-กลูโคโน-1, 5-แลกโทน	-
มอลโทส	+	กรด 2-คีโทกลูโคนิก	-
แอลฟา-ทรีฮาโลส	-	กรด 5-คีโทกลูโคนิก	-
เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-	ดี-กลูคูโรเนต	-
เซลโลไบโอส	+	กรดดี-กาแลกทูโรนิก	-
ซาลิซิน	+	ดีแอล-แลกเทต	+
เมลิไบโอส	-	ซัคซิเนต	+
แลกโทส	-	ซิเตรต	+
ราฟฟิโนส	-	เอทานอล	+
เมลไซโทส	-		

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	-	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+
ไนไตรต์	-	คาตาเวอริน	+
เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์	+		

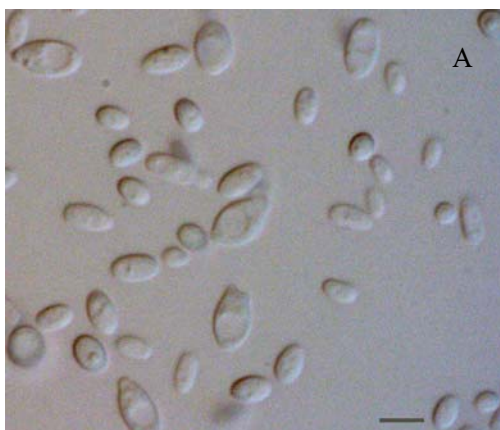
ลักษณะอื่นๆ:

การเจริญที่ 25 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	-
การเจริญที่ 30 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	-
การเจริญที่ 35 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	+
การเจริญที่ 37 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	+
การเจริญที่ 42 °C	-	การทำปฏิกิริยากับสไลโดอะซิเนมบลูปี	-
การเจริญที่ 45 °C	-	การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ



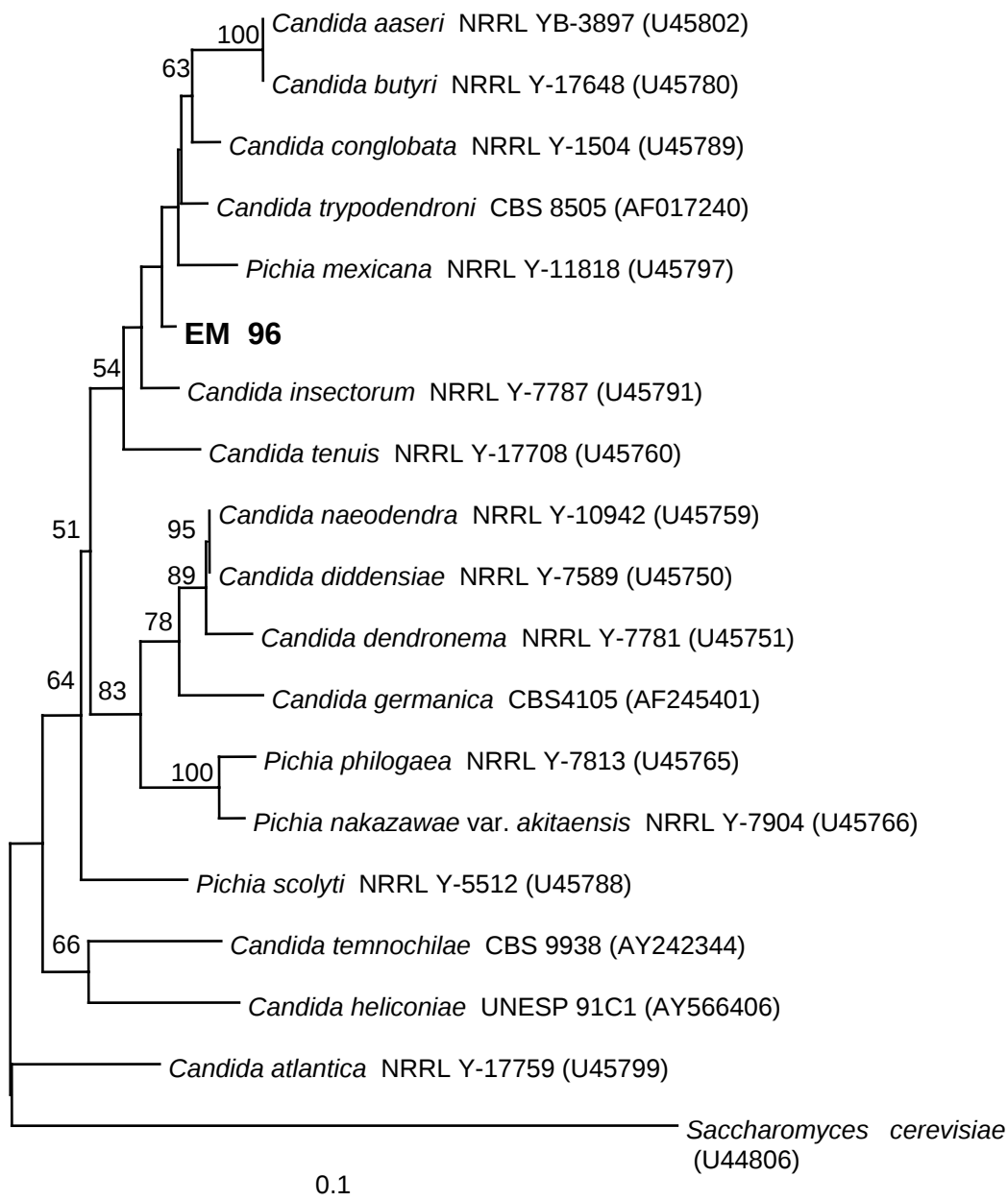
ภาพที่ 23 แสดงลักษณะวิทยาของเซลล์ของ *Candida* sp. EM 53 ที่เลี้ยงในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 5 ไมโครเมตร)

2. *Candida* sp. EM 96

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ EM 96 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida insectorum* NRRL Y-7787 โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 4 นิวคลีโอไทด์ใน 530 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/ D2 ของ 26S rDNA หรือเท่ากับ 0.7 เปอร์เซ็นต์ จากความแตกต่างดังกล่าว EM 96 อาจเป็นสายพันธุ์หนึ่งในสปีชีส์ *C. insectorum* NRRL Y-7787 หรือสปีชีส์ใหม่ และเมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการพบว่า EM 96 cluster กับ *C. insectorum* NRRL Y-7787, *C. conglobata* NRRL Y-1504, *C. trypodendroni* CBS 8505, *C. aaseri* NRRL YB-3897, *Pichia mexicana* NRRL Y-11818, *C. butyri* NRRL Y-17648 และ *C. tenuis* NRRL Y-17708 (ภาพที่ 24) ทั้งนี้การที่จะสรุปว่า EM 96 เป็นสปีชีส์ใหม่หรือไม่จำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม

สายพันธุ์ EM 96 พบว่ามีการแตกหน่อแบบหลายชั่ว ไม่สร้างเส้นใย ไม่สร้าง
 แอสโคสปอร์ ไม่แอสซิมิเลตไนเตรต ไม่ทำปฏิกิริยากับสปีดอะโซเนียมบลูปี และไม่สร้าง
 เอนไซม์ยูเรียเอส ดังนั้นจึงจำแนกเป็นสกุล *Candida* และเนื่องจากยังไม่รู้แน่นอนว่าเป็นสปีชีส์
 เดียวกันกับ *C. insectorum* NRRL Y-7787 หรือไม่นั้น ดังนั้นจึงจัดจำแนกเป็น *Candida* sp.

EM 96



ภาพที่ 24 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส EM 96 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

ลักษณะของ *Candida* sp. EM 96

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายชั่ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า เซลล์มีรูปร่างรูปไข่ มีขนาด (0.7)-(1.4) x (0.9)-(1.5) ไมโครเมตร อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือ เป็นกลุ่ม เซลล์ตกตะกอนที่ก้นหลอด

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า โคโลนีมีสีครีม ผิวด้าน ขอบมีลักษณะโค้ง/เว้าเล็กน้อย

Dalmau plate culture บนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar พบการสร้างเส้นใยเทียม

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	-
มอลโทส	-	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-

การใช้สารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	โซลูเบิลสตาร์ช	+
กาแลกโทส	+	กลีเซอรอล	+
แอล-ซอร์บิต	+	อีริทริทอล	+
ดี-ไรโบส	+	ไพริบิทอล	+
ดี-ไซโลส	+	ดี-กลูซิทอล	+

แอล-อะราบีโนส	-	ดี-แมนนิทอล	+
ดี-อะราบีโนส	+	กาแลกทิทอล	-
แอล-แรมโนส	+	ดี-กลูโคโน-1, 5-แลกโทน	+
ซูโครส	+	กรด 2-คีโทกลูโคนิก	-
มอลโทส	+	ดี-กลูคูโรเนต	-
แอลฟา-ทรีฮาโลส	+	กรดดี-กาแลกทูโรนิก	-
เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	+	ดีแอล-แลกเทต	+
เซลโลไบโอส	+	ซัคซินेट	+
ซาลิซิน	+	ซิเตรต	+
เมลิไบโอส	+	เอทานอล	+
แลกโทส	+		
ราฟฟิโนส	+		
เมเลไซโทส	+		

การใช้สารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	+	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+
ไนไตรต์	-	คาตาเวอริน	+
เอทิลลามีนไฮโดรคลอไรด์	+		

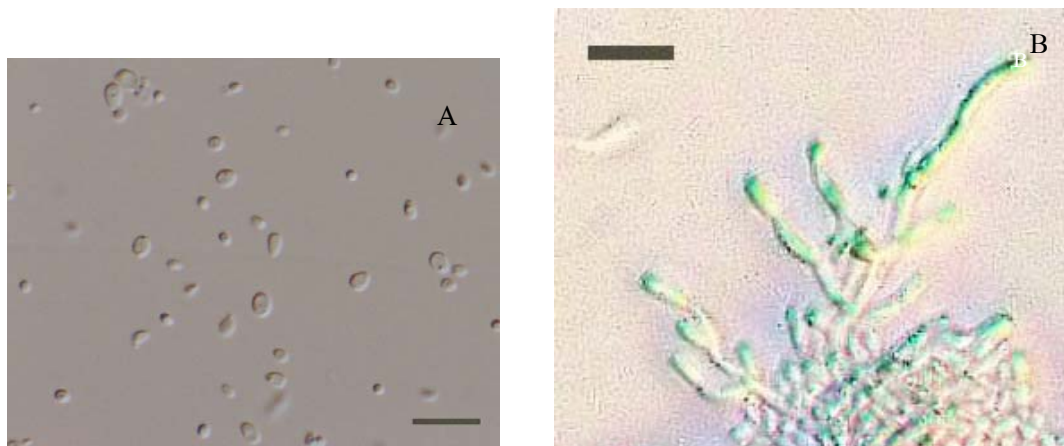
ลักษณะอื่นๆ:

การเจริญที่ 25 ⁰ C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	+
การเจริญที่ 30 ⁰ C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	+
การเจริญที่ 35 ⁰ C	+	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	+
การเจริญที่ 37 ⁰ C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	+
การเจริญที่ 42 ⁰ C	-	การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะโซเนียมบลูปี	-
การเจริญที่ 45 ⁰ C	-	การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ

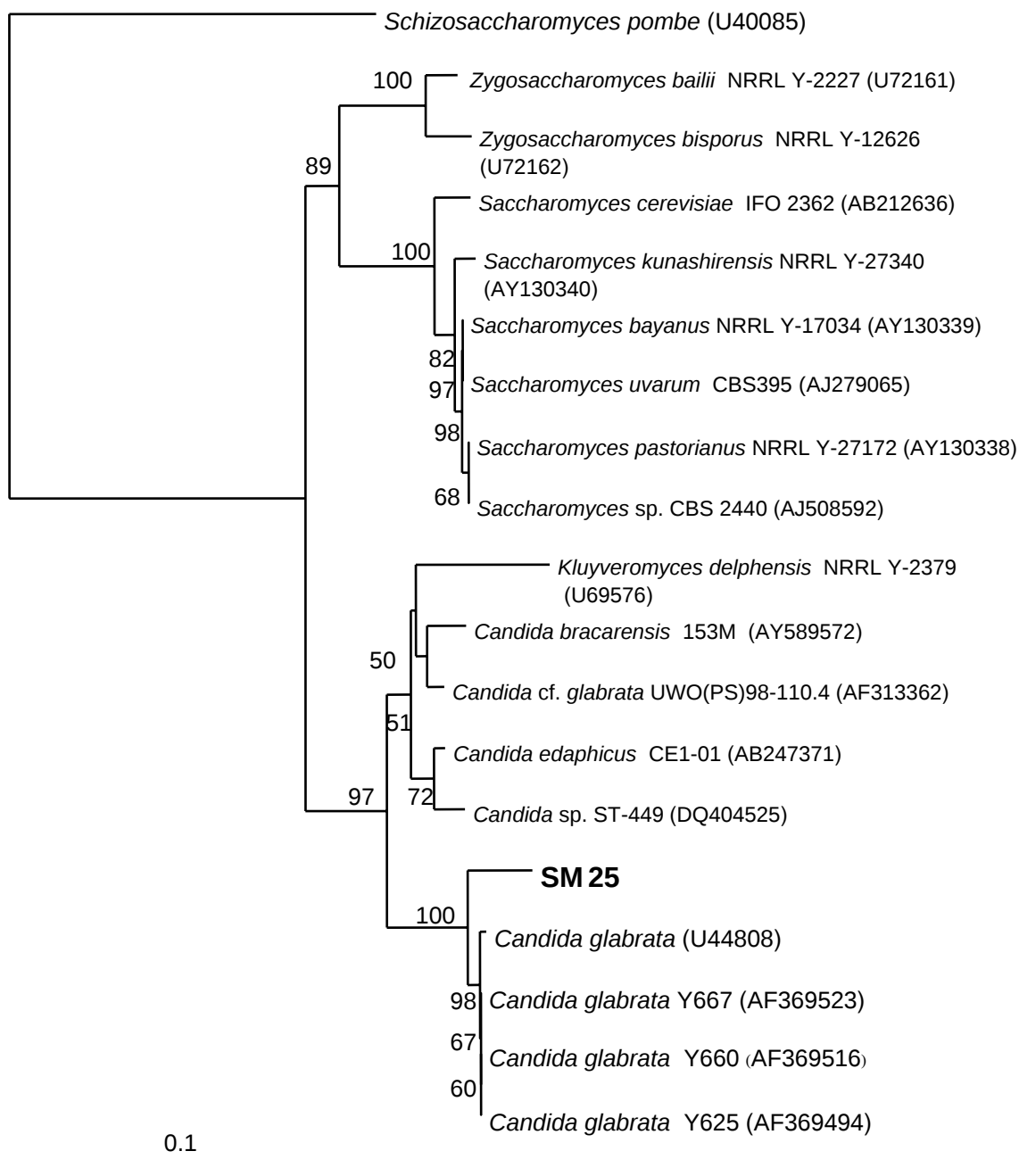


ภาพที่ 25 แสดงลักษณะวิทยาของ *Candida* sp. EM 96

- (A) เซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 5 ไมโครเมตร)
- (B) เส้นใยเทียมที่สร้างบนอาหาร Potato Dextrose Agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส (บาร์ = 2.5 ไมโครเมตร)

3. *Candida* sp. SM 25

จากผลการเทียบลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ของสายพันธุ์ SM 25 กับสปีชีส์ที่มีใน GenBank พบว่าใกล้เคียงที่สุดกับ *Candida* cf. *glabrata* Y660 โดยมีการแทนที่นิวคลีโอไทด์ 4 นิวคลีโอไทด์ใน 522 นิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA หรือเท่ากับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากความแตกต่างดังกล่าว SM 25 อาจเป็นสายพันธุ์หนึ่งในสปีชีส์ *Candida* cf. *glabrata* Y660 หรือสปีชีส์ใหม่ และเมื่อพิจารณาต้นไม้วิวัฒนาการพบว่า SM 25 cluster กับ *Candida* cf. *glabrata* Y660 (ภาพที่ 26) ทั้งนี้การที่จะสรุปว่า SM 25 เป็นสปีชีส์ใหม่หรือไม่จำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม



ภาพที่ 26 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการแสดงตำแหน่งของยีสต์รหัส SM 25 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างโดยอาศัยลำดับเบสในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA (ประมาณ 600 bp) ด้วย neighbour-joining method และ Kimura two-correction parameter ตัวเลขที่ nodes แสดงเปอร์เซ็นต์ของค่า bootstrap จากการทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ บาร์ 0.1 แทน evolutionary distance ของเบสที่เปลี่ยนไปต่อเบสหนึ่งตำแหน่ง

ลักษณะของ *Candida* sp. SM 25

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มีการแตกหน่อแบบหลายขั้ว

การเจริญในอาหารเหลว YM broth เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเซลล์มีรูปร่างค่อนข้างรี อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นกลุ่ม เซลล์ตกตะกอนที่ก้นหลอดและมีฝ้าที่ขอบหลอดอาหาร

การเจริญบนอาหารแข็ง YM agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าโคโลนีมีสีครีม ผิวมัน ขอบเรียบ

การสร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร 5% Malt extract agar และ Fowell's acetate agar เมื่อบ่มเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์

การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต:

กลูโคส	+	แลกโทส	-
กาแลกโทส	-	ราฟฟิโนส	-
ซูโครส	-	ทรีฮาโลส	+
มอลโทส	-	เมทิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไซด์	-

การใช้สารประกอบคาร์บอน:

กลูโคส	+	เมลิไบโอส	-
กาแลกโทส	-	แลกโทส	-
แอล-ซอร์โบส	+	เมลไโซโทส	-
ดี-ไรโบส	-	อีริทริทอล	-
ดี-ไซโลส	-	ไรบิทอล	-
แอล-อะราบิโนส	-	ดี-กลูซิทอล	-
ดี-อะราบิโนส	-	ดี-แมนนิทอล	-

แอล-แรมโนส	-	ดี-กลูโคโน-1,5-แลกโตน	+
ซูโครส	-	กรด 2-คีโทกลูโคนิก	-
มอลโทส	-	ดี-กลูโคเนต	+
แอลฟา-ทรีฮาโลส	+	ดีแอล-แลกเทต	+
เซลโลไบโอส	-	ซักซิเนต	+
ซาลิซิน	-	ซิเตรต	-
ราฟฟิโนส	-	ดี-กลูคูโรเนต	-
อินอซิทอล	-	กรดดี-กาแล็กทูโรนิก	-

การใช้สารประกอบไนโตรเจน:

ไนเตรต	-	เอทิลลามีนไฮโดรคลอไรด์	-
ไนไตรต์	+	แอล-ไลซีนไฮโดรคลอไรด์	+

ลักษณะอื่นๆ:

การเจริญที่ 25 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 50%	+
การเจริญที่ 37 °C	+	การเจริญบนอาหารที่มีกลูโคส 60%	+
การเจริญที่ 42 °C	+	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 10%	+
การเจริญที่ 45 °C	-	การเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 16%	+
การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส	-		
การทำปฏิกิริยากับสปีโดอะซิเนียมบลูปี	-		
การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน	+		

หมายเหตุ

+ = มีการหมัก หรือมีการเจริญ

- = ไม่มีการหมัก หรือไม่มีการเจริญ

สรุปผล

1. ยีสต์ที่ใช้ศึกษาครั้งนี้แยกจากตัวอย่างกึ่งไม่ร่วน ใบไม่ร่วน เปลือกไม้ และลูกไม้ร่วนที่เก็บจากป่าชายเลนจังหวัดตราดและจันทบุรี ภาคตะวันออกของประเทศไทย จำนวน 38 ไอโซเลต และจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานีภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 32 ไอโซเลต รวมทั้งหมด 70 ไอโซเลต

2. ยีสต์ทั้งหมด 70 ไอโซเลตที่นำมาจัดจำแนกโดยอนุกรมการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA พบว่ามียีสต์ที่เป็นสปีชีส์ที่มีรายงานแล้ว จำนวน 53 ไอโซเลต เนื่องจากการแทนที่นิวคลีโอไทด์เพียง 0-2 นิวคลีโอไทด์ หรือน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ตามเกณฑ์ของ Kurtzman and Robnett (1998) ซึ่งยีสต์เหล่านี้อยู่ใน Phylum Ascomycota, Class Hemiascomycetes, Order Saccharomycetales แบ่งเป็นยีสต์ใน Family Saccharomycetaceae 30 ไอโซเลต และ Family Candidaceae 23 ไอโซเลต สำหรับไอโซเลตที่อยู่ใน Family Saccharomycetaceae จัดจำแนกอยู่ใน 5 สกุล 9 สปีชีส์ คือ *Issatchenkia orientalis* (7 ไอโซเลต), *Debaryomyces pseudopolymorphus* (6 ไอโซเลต), *Pichia sydowiorum* (5 ไอโซเลต), *I. occidentalis* (2 ไอโซเลต), *Kodamaea ohmeri* (2 ไอโซเลต), *P. guilliermondii* (2 ไอโซเลต), *Williopsis saturnus* var. *subsufficiens* (2 ไอโซเลต), *D. vanrijae* var. *yarowia* (1 ไอโซเลต) และ *Kodamaea* sp. (3 ไอโซเลต) และมี 23 ไอโซเลตที่อยู่ใน Family Candidaceae จัดจำแนกเป็น 2 สกุล 8 สปีชีส์ คือ *Candida silvae* (5 ไอโซเลต), *C. intermedia* (3 ไอโซเลต), *C. tropicalis* (4 ไอโซเลต), *C. palmioleophila* (2 ไอโซเลต), *C. pseudointermedia* (2 ไอโซเลต), *C. fermentati* (1 ไอโซเลต), *C. fukuyamaensis* (1 ไอโซเลต), *C. natalensis* (1 ไอโซเลต), *C. parapsilosis* (1 ไอโซเลต), *Candida* sp. (1 ไอโซเลต) และ *Geotrichum* sp. (2 ไอโซเลต)

3. ยีสต์ที่จัดจำแนกเป็นสปีชีส์ใหม่อาศัยความแตกต่างโดยการแทนที่นิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับสปีชีส์ที่ใกล้ชิดที่สุด (closest known species) จำนวน 12 ไอโซเลตและในการศึกษาครั้งนี้เสนอเป็นสปีชีส์ใหม่โดยอาศัย polyphasic taxonomy ซึ่งประกอบด้วย อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม อนุกรมวิธานเคมี อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA และการวิเคราะห์ไฟโลจีนีพร้อมทั้งทำการตั้งชื่อ จำนวน 12 สปีชีส์ คือ *Candida bangsaphanensis* sp. nov., *Candida chanthaburiensis* sp. nov.,

Candida kungkrabaensis sp. nov., *Candida langsuanensis* sp. nov., *Candida phetchaburiensis* sp. nov., *Candida rayongensis* sp. nov., *Candida surathaniensis* sp. nov., *Candida tratensis* sp. nov., *Debaryomyces chumphonensis* sp. nov., *Debaryomyces siamensis* sp. nov., *Kluyveromyces siamensis* sp. nov. และ *Pichia prachuapensis* sp. nov. นอกจากนี้ยังมี ยีสต์ที่ไม่สามารถจัดจำแนกถึงระดับสปีชีส์ได้ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม จำนวน 5 ไอโซเลต คือ *Candida* sp. EM 53, *Candida* sp. EM 96, *Candida* sp. SM 25, *Debaryomyces* sp. EM 2 และ *Debaryomyces* sp. EM 64

4. จากผลการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกจากอินทรีย์วัตถุในป่าชายเลนพบว่า สปีชีส์ที่มีรายงานแล้วที่พบส่วนใหญ่ คือ *Issatchenkia orientalis* (7 ไอโซเลต) และ *Debaryomyces pseudopolymorphus* (6 ไอโซเลต) และสปีชีส์ใหม่ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Candida* โดยพบว่าจากการศึกษาในครั้งนี้พบยีสต์ที่เป็นสปีชีส์ใหม่ 17.1 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่นำมาจัดจำแนกทั้งหมด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

การสัมมนาระบบนิเวศป่าชายเลนแห่งชาติ ครั้งที่ 11. 2543. ป่าชายเลน: มุมมอง ปัญหา การแก้ไข และความต้องการของสังคมไทย.คณะกรรมการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

รัชชัย สุ่มประดิษฐ์. 2548. **Yeast diversity in soils from hill, evergreen, mixed deciduous, dry dipterocarp and pine forests of Nam Nao national park.** วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยวรรณ ชินฉะวิโรจน์ไพศาล. 2540. การแยกเชื้อยีสต์จากดอกไม้และผลไม้ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง. ปัญหาพิเศษ ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณี ดันติรุ่งกิจ. 2544. **เทคนิคด้านอนุวิทยาเพื่อการจัดจำแนกชนิดของยีสต์.** Workshop on Yeasts: Classification, Identification, Preservation and Application. Microbial systematics especially Yeasts, Management of culture collection.

วสันต์ จันทราทิตย์ และ วีรพงศ์ ลูกลิตานนท์. 2544. **ชีวสารสนเทศศาสตร์.** สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ

วันชัย อิงปัญจลาภ. 2536. **ป่าชายเลน.** โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, กรุงเทพฯ

ศศิธร จินดามรกฏ. 2543. **การพิสูจน์ความเหมือนเพื่อระบุเชื้อ การเก็บรักษา และการผลิตสารประกอบโพลีออลของยีสต์ทนเค็มที่แยกได้ในประเทศไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. 2549. **The species diversity of yeasts in some natural habitats of Thailand.** วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สนธิ อักษรแก้ว. 2541. ป่าชายเลน นิเวศวิทยา และการจัดการ. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดี และเอเอฟแอลพี. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

สาวตรี ล้มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

_____. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

สำนักงานป่าไม้เขตศรีราชา กรมป่าไม้. 2540. ป่าชายเลนภาคตะวันออกของประเทศไทย. เอส. พี. เค. ออฟเซท แอนด์ เซอร์วิส จำกัด, ชลบุรี.

Araujo, F. V., C. A. Soares, A. N. Hagler and L. C. Mendonca-Hagler. 1995. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a southeast Brazilian mangrove ecosystem. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 68: 91-9.

Arias, R., J. K. Burns, L. M. Friedrich, R. M. Goodrich and M. E. Parish. 2002. Yeast Species Associated with Orange Juice: Evaluation of Difference Identification Methods. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 1955-1961.

Bai, F., M. Takashima and T. Nakase. 1999. **Molecular phylogenetic studies on the symmetric Ballistoconidia-forming yeasts isolated from Yunan, China**. International Conference on Asian Network on Microbial Research, November 29-December 1, 1991, Chiang Mai, Thailand. 896p.

Barnett, J. A., R. W. Payne and D. Yarrow. 2000. **Yeast: Characteristics and identification**. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

- Cadez, N., G. Poot, G. P. Raspor and M. Th. Smith. 2003. *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora elermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov. novel apiculate yeasts species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 1671-1680.
- Kurtzman, C. P. 2003a. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other number members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachacea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhizula*. **FEMS Yeast Res.** 4: 233-245.
- _____. 2003b. Phylogenetic relationships among yeasts of the "Saccharomyces complex" determined from multigene sequence analysis. **FEMS Yeast Res.** 3: 417-432.
- _____ and J. W. Fell 1998. **The Yeasts: A Taxonomic study.** 4th ed. Else Science, Amsterdam.
- _____ and C. J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequence. **Antonie van Leeuwenhoek.** 73: 331-371.
- Coton, E., M. Coton, D. Levert, S. Casaregola and D. Sohier. 2005. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. **Int. J. Food. Microbiol.** 108: 130-135.
- Couto, M. W., R. G. Reizinho and F. L. Duarte. 2005. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterize non-Saccharomyces yeasts present during red wine fermentations. **Int. J. Food Microbiol.** 102: 49-56.
- Daniel, H.- M. and W. Meyer. 2003. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. **Int. J. Food Microbiol.** 86: 61-74.

Department of Biology, University of Miami, Florida. 2006. **Part of the ribosomal RNA gene family**. Available Source: [http:// www.fig. cox. Miami. Edu/~ cmallery/ 150/ gene/ C7. 19. 17a. families. rDNA](http://www.fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/C7.19.17a.families.rDNA), August 10, 2006.

Fell, J. W., A. Statzell-Tallman and C. P. Kurtzman. 2004. *Lachancea meyersii* sp. nov., an ascosporeogenous yeast from mangrove regions in the Bahama Island. **Studies Mycol.** 50: 359-363.

Foschino, R., S. Gallina, C. Andrichetto, L. Rossetti and A. Galli. 2004. Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. **FEMS Yeast Res.** 4: 609-618.

Fungsin, B., M. Hamamoto, V. Arunpaiojana, J. Sukhumavasi, P. Atthasampunna and T. Nakase. 2001. *Bensingtonia thailandica* sp. Nov. , a novel basidiomycetous yeast species isolated from plant leaves in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51: 1209-1213.

_____, _____, _____, _____, _____ and _____. 2002. *Kockovaella barringtoniae* sp. Nov., a new basidiomycetous yeast species isolated from plant leaf collected in a tropical rain forest in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 52: 281-284.

Golubev, W. I., M. Gadanho, J. P. Sampaio and N. W. Golubev. 2003. *Cryptococcus nemorosus* sp. nov. and *Cryptococcus perniciosus* sp. nov. related to *Papiliotrema sampaiotai* (*Tremellales*). **Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.** 53: 905-911.

Guillamo'n, M., J. Sabate', E. Barrio, J. Cano and A. Querol. 1998. Rapid Identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Arch. Microbiol.** 169: 387-392.

- Guffogg, S., S. Thomas-Hall, P. Holloway and K. Watson. 2004. A novel psychrotolerant member of the hymenomycetous yeasts from Antarctica: *Cryptococcus waticus* sp. nov. **Int. Syst. Evol. Microbiol.** 54: 275-277.
- Hall, S. T. and K. Watson. 2003. *Cryptococcus hyarrowii* sp. nov., a basidiomycetous yeast from Antarctica. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 52: 1033-1038.
- Hagler, A. N., C. A. Rosa, P. B. Morais, L. C. Mendonca-Hagler, G. M. Franco, F. V. Araujo and C. A. Soares. 1993. Yeasts and coliform bacteria of water accumulated in bromeliads of mangrove and sand dune ecosystems of southeast Brazil. **Can. J. Microbiol.** 39: 973-977.
- Hirai, A., R. K. Kano, K. Makimura, E. R. Duarte, J. S. Hamdan, M. Lachance, H. Yamaguchi and A. Hasegawa. 2004. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animal. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54: 623-627.
- Hong, S. G., K. S. Bac, M. Herzberg, A. Titze and M. A. Lachance. 2003. *Candida kunwiensis* sp. nov. a yeast associated with flowers and bumblebees. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 367-372.
- Inacio, J., G. Rodrigues, P. Sobral and A. Fonseca. 2004. Characterisation and classification of phylloplane yeasts from Portugal related to the genus *Taphrina* and description of five novel *Lalaria* species. **FEMS Yeast Res.** 4: 541-555.
- Jakubowski, H. 2002. **A Primer in Molecular Genetics and Genomics**. Available Source: <http://www.employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/SrSemMedEthics/Human%20Genome%20Project/DNA1.html>, August 13, 2006.

- Jindamorakot, S., S. Limtong, S., T. Nakase, H. Kawasaki, S. Am-in, T. Thuy, N. Duy, W. Potacharoen and M. Tanticharoen. 2004. *Candida easanensis* sp. nov., *Candida pattaniensis* sp. nov. and *Candida nakronratchasimensis* sp. nov., three new species of yeasts isolated from insect frass in Thailand. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 50: 261-269.
- Jurado, G. G., C. P. Kurtzman, W. T. Starmer and I. S. Martins. 2003. *Metschinokowia vanudenii* sp. Nov. and *Metschinokowia lachancei* sp. Nov. from flowers and associated insects in North America. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 53: 1665-1670.
- Limtong, S., T. Nakase, H. Kawasaki, N. Srisuk, W. Yongmanitchai, H. Yurimoto 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 _____. 2005. *Pichia thermomethanolica* sp. nov., a novel thermotolerant, methylotrophic yeast isolated in Thailand. **Int. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 2225-2229.
- Lopandic, K., S. Zelger, L. K. Banzky, F. Eliskases-Lechner and H. Prillinger. 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiol.** 23: 341-350.
- Makimura, K. 2001. **Key sequences and range of Identification.** Available Source: http://www.pfdb.net/myhtml/genosp_malassezia.html, August 10, 2006.
- Maoura, N., M. mbaiguinam, H. V. Nguyen, C. Gaillardin and J. Pourquie. 2005. Identification and typing of the yeast strains isolated from bili bili, a traditional sorghum beer of Chad. **Afr. J. Biotechnol.** 4: 646-656.

- Martini, V., C. P. Kurtzman, S. A. Meyer and E. B. Neill. 2005. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascospore state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov.. **FEMS Yeast Res.** 5: 463-469.
- McPherson, M. J., P. Quirk and G. R. Taylor. 1991. **PCR A Practical Approach**. United States by Oxford University Press, New York.
- _____ and S. G. Moller. 2000. **PCR The Basics from background to bench**. Bios Scientific Publishers Limited, New York.
- Molnar, O and H. Prillinger. 2005. Analysis of yeast isolates related to *Metschnikowia pulcherrima* using the partial sequences of the large subunit rDNA and the actin gene; description of *Metschnikowia andauensis* sp. nov.. **Syst. Appl. Microbiol.** 28: 717-726.
- Nagatsuka, Y., H. Kawasaki, S. Limtong, K. Mikata and T. Seki. 2002. *Citeromyces siamensis* sp. nov., a novel halotolerant yeast isolated in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 52: 2315-2319.
- Nakase, T., T. Nagahama, M. Hamanaoto and K. Horikoshi. 2003. *Rhodotorula benthica* sp. nov. and *Rhodotorula catyptogenae* sp. Nov., a novel yeast species from animals collected from the deep-sea floor and *Rhodotorula lysiniphila* sp. Nov., which is related phylogenetically. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 897-903.
- _____, _____, _____, _____ and Y. Takaki. 2003. *Cryptococcus surugaensis* sp. Nov., a novel yeast species from sediment collected on the deep-sea floor of Suruga Bay. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 2095-2098.
- Rodrigues, M. G. and A. Fonseca. 2003. Molecular Systematics of the dimorphic ascomycetes genus *Taphrina*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 607-616.

- Rose, H., J. S. Harrison. 1969. **The Yeasts. volume 1: Biology of Yeast**. Academic Press, London and New York.
- Scorzetti, G., J. W. Fell, A. Fonseca and A. S. Tallman. 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Res.** 2: 495-517.
- Sipiczki, M. 2003. *Candida zemplinina* sp. Nov., osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 2079-2083.
- Soares C. A., M. Maury, F. C. Pagnocca, F. V. Araujo, L. C. Mendonca-Hagler and A. N. Hagler. 1997. Ascomycetous yeasts from tropical intertidal dark mud of southeast Brazilian estuaries. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 43: 265-272.
- Sumpradit, T., S. Limtong, W. Yougmanitchai, H. Kawasaki and T. Seki. 2005. *Tetrapisispora namnaonensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species isolated from forest soil of Nam Nao national park, Thailand. **J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 1735-1738.
- Thanh, V. N., M. S. Smit, N. Moleleki and J. W. Fell. 2004. *Rhodotorula cycloclastica* sp. nov., *Rhodotorula retinophila* sp. nov. and *Rhodotorula terpenoidalis* sp. nov. three limonene-utilizing yeasts isolated from soil. **FEMS Yeast Res.** 4: 857-863.
- Takashima, M. and T. Nakase. 1998. *Bullera penniseticola* sp. nov. and *Koeckera sacchari* sp. nov., two new yeast species isolated from plants in Thailand. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 48: 1025-1030.
- _____, _____, T. Sugita and T. Shinoda. 2003. Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescens* and *Cryptococcus peneaus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 1187-1194.

Teixeira C. P., M. M. Marini, J. R. Nicoli, Y. Antoni, Rogerio P. Martins, M. Lachance and C. A. Rosa. 2003. *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with Stinoless bees. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 339-343.

Vanfleteren J. 2000. **Principle of sequencing**. Available Source: <http://www.users.ugent.be/~avierstr/principles/seq.html>, February 26, 2006.

Wang, Q. M. and F. Y. Bai. 2004. Four new yeast species of the genus *Sporobolomyces* from plant leaves. **FEMS Yeast Res.** 4: 579-586.

_____, _____, J. H. Zhao and J. H. Jia. 2003. *Bensingtonia changbaiensis* sp. nov. and *Bensingtonia sorbi* sp. nov., novel ballistoconidium-forming yeast species from plant leaves. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 2085-2089.

Walker G. M. 1998. **Yeast physiology and Biotechnology**. John Wiley and Sons Ltd, England.

Wuczkowski, M. and H. Prillinger. 2004. Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("Nationalpark Donauauen"). **Microbiol. Res.** 159: 263-275.

