

ความหลากหลายของยีสต์บริเวณศูนย์ศึกษาธรรมชาติและ อนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี Diversity of Yeasts in the Nature Education Center for Mangrove Conservation and Ecotourism, Chonburi Province

รัฐดา จันทร์กลิ่น* และประภาพรพรณ กุ้งแก้ว

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

สมจิตร อำอินทร์ และศศิธร จินดามรกฏ

หน่วยวิจัยเทคโนโลยีทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อุทยานวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Ruthada Chanklan* and Prapapan Kungkaew

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Somjit Am-In and Sasitorn Jindamorakot

Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology,
Thailand Science Park, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

ยีสต์ 135 ไอโซเลท ถูกแยกมาจากตัวอย่างดิน น้ำกร่อย ใบไม้ ดอกไม้ ผลไม้ รากไม้ ซากใบไม้ และเห็ด รวมจำนวน 96 ตัวอย่าง จากบริเวณศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี ด้วยเทคนิค enrichment ในอาหารเหลว yeast extract-malt extract ที่เติม sodium propionate 0.2 เปอร์เซ็นต์ chloramphenicol 0.01 เปอร์เซ็นต์ และ sodium chloride 2.0 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล ด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโดเมน D1/D2 ใน 26S rDNA พบว่าเป็นยีสต์ที่มีการอธิบายสปีชีส์แล้วจำนวน 131 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียยีสต์จำนวน 23 ไอโซเลท ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* และ *Ustilago* ยีสต์อื่น ๆ อีก 108 ไอโซเลท ถูกจัดเป็นแอสโคไมยซีตยีสต์ในสกุล *Aureobasidium*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Phaeoacremonium* และ *Pichia* และพบว่ายีสต์ที่แยกได้ส่วนใหญ่ถูกจำแนกเป็น *Pichia kudriavzevii* นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ 5.8S rDNA ทำให้จำแนกยีสต์ไอโซเลท CH-140, CH-141, CH-142, CH-143 ที่แยกได้จากดินว่าเป็นแอสโค-

มายส์ตัสยีสต์สปีชีส์เดียวกัน และเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ในสกุล *Candida*

คำสำคัญ : ยีสต์, ความหลากหลาย, การจัดจำแนก, ป่าชายเลน

Abstract

Yeasts 135 isolates were isolated from 96 natural samples i.e., soil, brackish water, leaf, flowers, fruit, root, mangrove litters and mushroom collected from the nature education center for mangrove conservation and ecotourism in Chonburi using enrichment technique in yeast extract-malt extract (YM) broth supplemented with 0.2 % sodium propionate, 0.01 % chloramphenicol and 2.0 % sodium chloride, incubated at 30°C for 48 h. Nucleotide analysis of the D1/D2 domain of the large subunit (LSU) *rDNA* gene revealed that the sequences of 131 isolates were known species within basidiomycetous yeast, 23 isolates in genera *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Rhodospordium*, *Rhodotorula* and *Ustilago*. Other 108 isolated yeast strains were ascomycetous yeast in genera *Aureobasidium*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Phaeoacremonium* and *Pichia*. Therefore, mostly isolated yeast strains were identified as *Pichia kudriavzevii*. Furthermore, analysis of the D1/D2 domain of 26S *rDNA* and internal transcribed spacer (ITS) region and 5.8S *rDNA* identified that yeast isolate CH-140, CH-141, CH-142, and CH-143 belong to the same species and were assigned as a novel *Candida* species.

Keywords: yeast, diversity, identification, mangrove

1. คำนำ

ป่าชายเลนเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ ประกอบด้วยพันธุ์ไม้หลากหลายชนิดที่ขึ้นอยู่ตามบริเวณชายฝั่งทะเล ปากแม่น้ำ หรืออ่าว และตามเกาะต่าง ๆ ส่วนใหญ่ประกอบด้วยพันธุ์ไม้สกุลโกงกาง (*Rhizophora*) ปัจจัยทางกายภาพของป่าชายเลนในแต่ละพื้นที่ไม่ว่าจะเป็นความเค็มของน้ำทะเล ระดับน้ำทะเลที่ท่วมถึง อุณหภูมิ รวมไปถึงปริมาณแร่ธาตุ และสารอินทรีย์ต่าง ๆ จะแตกต่างกันไป ปัจจัยทางกายภาพเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดลักษณะของประชากรจุลินทรีย์รวมถึงยีสต์ด้วย

ยีสต์เป็นราที่ดำรงชีพเป็นเซลล์เดี่ยว ถูกนำมาใช้ประโยชน์หลากหลายทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เกษษกรรม พลังงาน และการผลิตเอทานอล มีรายงานการใช้ยีสต์ที่แยกจากมหาสมุทรแปซิฟิก

และน้ำชายฝั่งในทะเลญี่ปุ่นมาประยุกต์ใช้ในการผลิตกรดแกมมาอะมิโนบิวทริก (Masuda *et al.*, 2008) รวมทั้งการนำยีสต์มาใช้เป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *Colletotrichum capsici* ที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคแอนแทรคโนสในพริก (Chanchaichaovivat *et al.*, 2007) ยีสต์ที่พบและมีการกระจายในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ นั้นขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารอินทรีย์ การกระจายของสปีชีส์รวมทั้งจำนวนและลักษณะทางเมแทบอลิซึมของยีสต์ที่พบนั้นถูกควบคุมจากสภาวะของสิ่งแวดล้อม ยีสต์ที่พบในทะเลถูกค้นพบครั้งแรกจากทะเลเขตแอตแลนติก แยกได้จากน้ำทะเล ตะกอนดินสาหร่ายทะเล ปลา สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่พบในทะเล รวมถึงนกทะเล โดยยีสต์ที่พบบริเวณน้ำสะอาดจะดำรงชีวิตในสภาวะที่ใช้ออกซิเจน

(aerobic forms) แต่ในสภาวะที่มีมลพิษหรือของเสีย ยีสต์ที่พบจะดำรงชีพในลักษณะที่ไม่ใช้ออกซิเจน (fermentative forms) โดยจะพบยีสต์ได้มากใน ตะกอนโคลนหรือเลนมากกว่าในตะกอนทราย และการแยกยีสต์ในระดับตะกอนที่มีความลึกมากขึ้นจะ พบยีสต์ได้น้อยลง (Kutty and Philip, 2008)

ป้าชายเลนเป็นแหล่งที่มีการศึกษาถึงความ หลากหลายของยีสต์และความสัมพันธ์ของยีสต์ต่อ สิ่งมีชีวิตที่พบในระบบนิเวศป้าชายเลน (de Araujo *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 1997; Statzell, Belloch and Fell, 2008; Fell *et al.*, 2010) การศึกษา เกี่ยวกับยีสต์และการจัดจำแนกยีสต์ที่พบในป้าชาย เลนในประเทศไทยนั้นมีอยู่หลายรายงานด้วยกัน เช่น รายงานการพบยีสต์ สปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จาก ตัวอย่างที่เก็บจากป้าชายเลนในบริเวณจังหวัดพังงา (Limtong *et al.* 2007; Limtong *et al.*, 2008) รายงานการศึกษาความหลากหลายของยีสต์และจัด จำแนกยีสต์ที่พบในน้ำจากป้าชายเลนของสถานี วิจัยทรัพยากรชายฝั่งระนอง ในเขตอุทยานแห่งชาติ แลหมสน ที่รายงานถึงแอสโคไมยซีตยีสต์ระยะที่ไม่ พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (anamorphic asco- mycetous yeasts) สปีชีส์ใหม่ในสกุล *Candida* คือ *Candida laemsonensis* sp. nov., *Candida anda- manensis* sp. nov. และ *Candida ranongensis* sp. nov. (Am-In *et al.*, 2008; Am-In *et al.*, 2011) และรายงานของ Limtong and Yongmanitchai (2010) ที่แยกยีสต์จากซากพืช เปลือกไม้ ใบไม้ร่วง และกิ่งไม้หักที่เก็บได้บริเวณป้าชายเลนจังหวัด จันทบุรี ที่เป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ 3 สปีชีส์ ในสกุล *Candida* คือ *Candida chanthaburiensis* sp. nov., *Candida kungkrabaensis* sp. nov. และ *Candida suratensis* sp. nov. อีกทั้งมีรายงานของ Nitiyon *et al.* ในปี 2011 ที่แยกยีสต์สายพันธุ์ WB15^T ที่ สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้จากน้ำกร่อยที่เก็บจาก ป้าชายเลนในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และรายงาน

เป็นสปีชีส์ที่พบใหม่ในสกุล *Candida* และให้ชื่อว่า *Candida prachuapensis* sp. nov. แต่ยังไม่พบ รายงานการศึกษาถึงความหลากหลายของยีสต์และ จัดจำแนกยีสต์จากป้าชายเลน บริเวณศูนย์ศึกษา ธรรมชาติและอนุรักษ์ป้าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยว เชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี

การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยพื้นฐานของ วิวัฒนาการและพิจารณาความเหมือนหรือต่างของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ สามารถใช้แสดง ความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการในทุกระดับอนุกรม วิธาน (Kurtzman, 1992) การเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอไรโบโซม (ribosomal DNA) หรือ rDNA นิยมใช้มากสำหรับการประเมิน ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากไรโบโซมปรากฏในเซลล์สิ่งมีชีวิตทุกชนิด และมีจุดเริ่มต้นของวิวัฒนาการร่วมกัน ลำดับนิวคลี โอไทด์ใน rDNA มีทั้งบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) และบริเวณผันแปร (variable region) ที่มี วิวัฒนาการมาก ทำให้สามารถใช้บริเวณอนุรักษ์ใน การอ้างอิงเพื่อเปรียบเทียบหาความแตกต่างของ บริเวณผันแปรได้ (Kurtzman, 1992; Kurtzman and Robnett, 1988) D1/D2 โดเมนอยู่บริเวณ ปลายด้าน 5' ของ 26S rDNA ใน *Saccharomyces cerevisiae* ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 63-642 ของยีน rRNA เป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็วจึงเป็นบริเวณ ที่มีความแตกต่างมากในบรรดาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ 26S rDNA ซึ่งความแตกต่างบริเวณนี้เพียงพอที่จะใช้จัดจำแนกสปีชีส์ของยีสต์ได้ (Kurtzman and Robnett, 1988) และเป็นวิธีการที่ได้รับการ ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากทำได้รวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง

ดังนั้นผู้วิจัยจึงแยกและจัดจำแนกยีสต์ที่แยก ได้จากตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณป้าชายเลน ณ ศูนย์ ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป้าชายเลนเพื่อการ ท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี โดยใช้การศึกษา

ระดับโมเลกุลด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 โดเมนของ 26S rDNA แสดงความสัมพันธ์ของยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่ได้แยกได้ด้วย phylogenetic tree ซึ่งยีสต์ที่แยกและจำแนกแล้วจะถูกเก็บเพื่อใช้เป็นคลังเชื้อในการศึกษาวิจัยต่อยอดและนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต รวมทั้งใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานแสดงถึงทรัพยากรของประเทศและการอนุรักษ์

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกยีสต์

ทำการเก็บตัวอย่างดิน น้ำกร่อย ใบไม้ ดอกไม้ ผลไม้ รากไม้ ซากใบไม้ และเห็ดจาก 12 ตำแหน่ง ในบริเวณป่าชายเลน ณ ศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี รวมจำนวน 96 ตัวอย่าง และนำมาแยกยีสต์โดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวสูตร YM (yeast extract-malt extract) pH 4.5 ที่เติม sodium chloride 2.0 เปอร์เซ็นต์ sodium propionate 0.2 เปอร์เซ็นต์ และ chloramphenicol 0.01 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำหลอดที่พบการเจริญของยีสต์มาทำการ streak บนอาหารแข็งสูตร YM ที่เติมเกลือ sodium chloride 2.0 เปอร์เซ็นต์ เลือกโคโลนียีสต์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน นำมา re-streak จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์

2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะรูปร่าง ขนาด สี ผิวหน้า ขอบ และการยกตัวของโคโลนีด้วยกล้องสเตอริโอสโคป การรูปร่างของเซลล์และการเพิ่มจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

2.3 การสกัด genomic DNA ของยีสต์

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ของยีสต์ โดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Manitis *et al.*

(1982) โดยนำยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างบนอาหารแข็ง YM มาแขวนลอยในสารละลาย lysis buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่มีส่วนผสมของ Tris HCl 100 มิลลิโมลาร์ EDTA 30 มิลลิโมลาร์ SDS เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ pH 8.0 นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที เติมสารละลาย potassium acetate เข้มข้น 2.5 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสชั้นบนมาเติมสารละลาย chloroform : isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บเฉพาะส่วนใสมาทำซ้ำในขั้นตอนการสกัดด้วยสารละลาย chloroform : isoamylalcohol (24:1) หลังจากนั้นนำส่วนใสมาเติม isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 14,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 นาที ล้างตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ และเก็บตะกอนดีเอ็นเอโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ปลอຍให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำนาโนปลอดเชื้อ ตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., USA)

2.4 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR reaction)

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนบริเวณโดเมน D1/D2 บน 26S rDNA จากจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ที่แยกได้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ใน Taq buffer (potassium chloride 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl 20 มิลลิโมลาร์ magnesium

chloride 0.25 มิลลิโมลาร์ pH 8.0) ซึ่งมี dNTP mixture 250 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ forward primer F63 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') และ reverse primer LR3 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG-3') อย่างละ 3 พิโคโมลาร์ และใช้ Taq DNA polymerase (Invitrogen TM life technology, Brazil) 2.5 ยูนิต และเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 และ ITS2 โดยใช้สภาวะเดียวกันกับการเพิ่มชิ้นส่วนบริเวณโดเมน D1/D2 ดังที่กล่าวมาข้างต้น แต่ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ 18S และ 28S rRNA gene ที่ครอบคลุมบริเวณ 5.8S rDNA โดยใช้ pITSF (5'-GTC GTA ACA AGG TTA ACC TGC GG-3') เป็น forward primer และ pITSR (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') เป็น reverse primer ใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 3 ขั้นตอน คือ (1) ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ สำหรับการ pre-heat (2) ใช้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สำหรับ denaturation ใช้อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 นาที ในการ annealing และใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2.30 นาที สำหรับ extension โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 30 รอบ (3) ใช้ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 1 รอบ เพื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์

2.5 การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ สังเกตวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี (Macrogen, Korea)

2.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้โดยใช้ BLASTn search (Altschul *et al.*, 1997) และนำมาเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสปีชีส์ที่ใกล้เคียงกันจาก NCBI database โดยใช้ multiple alignment-program CLUSTAL_X version 2.0 สร้าง phylogenetic tree ตาม Kimura's two parameter system (Kimura, 1980) โดยใช้วิธี neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) ประเมินความเชื่อถือของ phylogenetic tree โดยการทดสอบทางสถิติด้วย bootstrap method ซึ่งมีการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985)

3. ผลและวิจารณ์

3.1 การแยกยีสต์จากตัวอย่างธรรมชาติ

จากการแยกยีสต์จากตัวอย่างธรรมชาติ ได้แก่ ดิน น้ำ ใบไม้ ดอกไม้ ผลไม้ รากไม้ ซากใบไม้ และเห็ด ที่เก็บจากป่าชายเลน บริเวณศูนย์ศึกษารวมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี จำนวน 96 ตัวอย่าง โดยใช้ enrichment technique ในอาหารเหลว YM ที่มีเกลือ sodium chloride เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยการเจริญของยีสต์ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบนผิวหน้าอาหารและเป็นตะกอนสีขาวขุ่นบริเวณก้นหลอด ซึ่งเมื่อนำมาแยกให้เป็นยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนอาหารแข็ง YM พบว่าสามารถแยกยีสต์ได้ 135 ไอโซเลท เมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ทั้ง 135 ไอโซเลท เลี้ยงบนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยตรวจสอบขนาดและลักษณะของโคโลนี ขอบของโคโลนี การยกตัว ผิวหน้า และสีของโคโลนี พบว่ายีสต์ที่แยกได้มีโคโลนีสีขาว ครีမ် ขมพู จนถึง

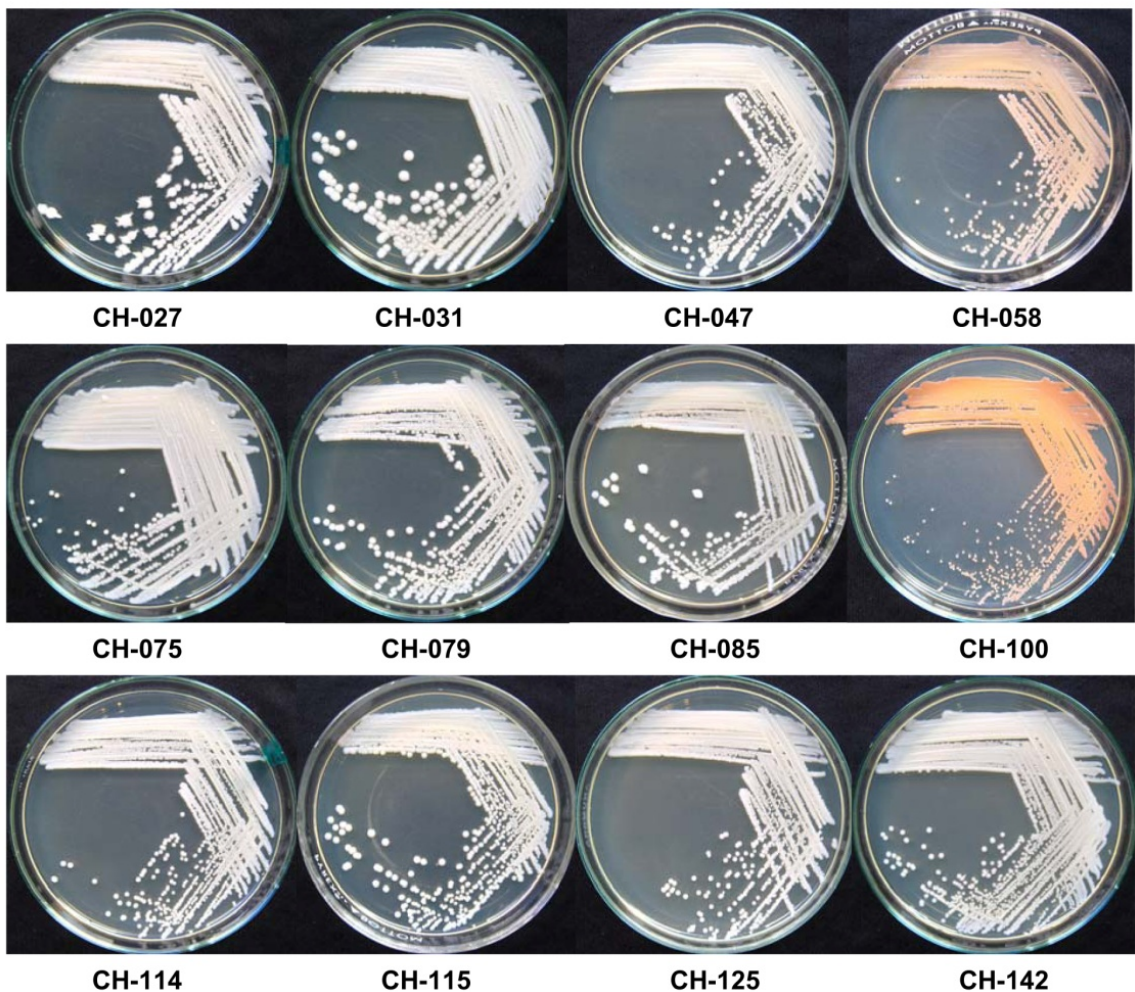


Figure 1 Colony morphology of represented yeast isolates CH-027: white to cream colored, smooth, butyrous and smooth to lobed margin with sparse; CH-031: white colored, smooth, butyrous, soft glistening and convex with fringed margin; CH-047: white to cream colored, smooth, glabrous, glistening, entire margin; CH-058: pink colored, smooth, glistening, entire margin; CH-075: white to cream, venose, butyrous, convex with entire margin; CH-079: white to cream colored, smooth, butyrous, glistening, entire margin; CH-085: white to cream colored, smooth, butyrous, glistening, entire margin; CH-100: salmon orange colored, smooth, butyrous, glistening, slightly raised with entire margin; CH-114: white colored, smooth, butyrous, semi-glistening, entire margin; CH-115: yellowish white colored, smooth, soft, glistening, entire margin; CH-125: white to cream colored, smooth, butyrous, semi-glistening, entire margin; CH-142 white to cream colored, smooth, butyrous, glistening, entire margin

สีส้มแดง มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันดังตัวอย่างแสดงใน Fig. 1 และเมื่อศึกษารูปร่างของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ยีสต์ที่แยกได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ารูปร่าง ขนาด และการแตกหน่อของยีสต์บางไอโซเลท ดังตัวอย่างแสดงใน Fig. 2

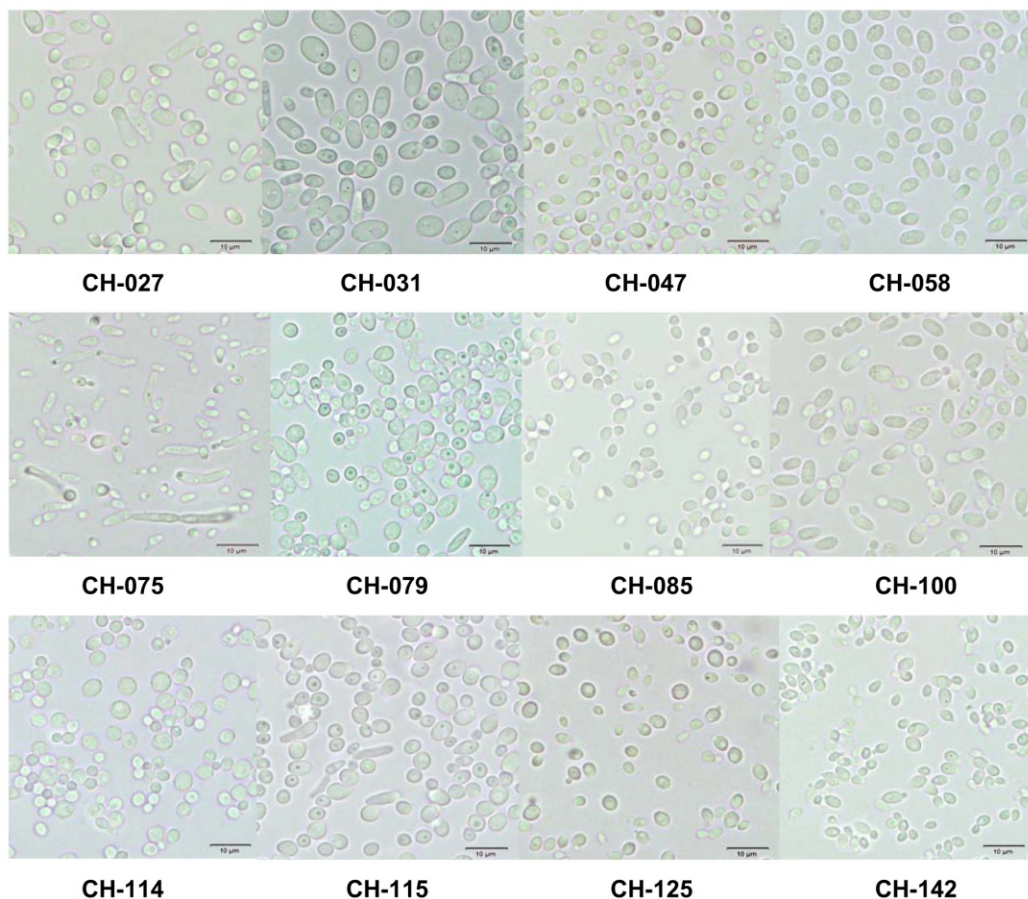


Figure 2 Cell morphology of represented yeast isolates (Scale bar = 10 µm) CH-027: oval to elongate, single or in pairs, multilateral budding; CH-031: ellipsoidal to cylindrical, single or in pairs, multilateral budding; CH-047: spheroidal to subspheroidal, single or in pairs, multilateral budding; CH-058: oval, single or in pairs, multilateral budding; CH-075: oval to cylindrical, single, in pairs or in short chain, multilateral budding; CH-079: spheroidal, ellipsoidal to elongate, single or in pairs, multilateral budding; CH-085: oval, single or in pairs, multilateral budding; CH-100: oval to elongate, single or in pairs, bipolar budding; CH-114: spheroidal to oval, single or in pairs, multilateral budding; CH-115: oval to cylindrical, single, in pairs or in groups, multilateral budding; CH-125: oval, single or in pairs, multilateral budding; CH-142 oval, single or in pairs, multilateral budding

3.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์

จากการจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมด 135 ไอโซเลท โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1/D2 ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ ของ rDNA พบว่ายีสต์ที่แยกได้เป็นยีสต์ที่ทราบสปีชีส์ (known species) ในกลุ่มเบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ จำนวน 23 ไอโซเลท ใน 5 สกุล คือ *Cryptococcus*, *Pseudozyma*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* และ *Ustilago* รวม 8 สปีชีส์ คือ *Cryptococcus heveanensis*, *Pseudozyma hubeiensis*, *Rhodospiridium paludigenum*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula calyptogenae*, *Rhodotorula*

mucilaginosa, *Rhodotorula* sp. และ *Ustilago sparsa* ดังแสดงใน Table 1 รายงานก่อนหน้านี้ถึง เบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ที่พบในการศึกษานี้ เช่น *Rhodospiridium paludigenum* ที่พบโดย Fell and Statzell ในปี ค.ศ.1980 โดยแยกได้จากตัวอย่างที่ เก็บจากน้ำบริเวณป่าชายเลนจากทางใต้ของรัฐ ฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา *Rhodotorula calyptogenae* ที่ถูกแยกได้จากหอย *Calyptogena* sp. ที่ เก็บจากพื้นใต้ทะเลลึกในมหาสมุทรแปซิฟิกของ ประเทศญี่ปุ่น (Nagahama *et al.*, 2003) และ *Pseudozyma hubeiensis* ที่ถูกแยกได้จากใบไม้ (Wang *et al.*, 2006)

Table 1 Identification of 23 isolated yeast strains as known species in Basidiomycota

Isolate	Accession number and % identities	Closest species
CH-009, CH-092	AF075467 (98 %)	<i>Cryptococcus heveanensis</i> CBS569 ^T
CH-001, CH-005, CH-008, CH-021, CH-023	DQ008953 (100 %)	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> CBS10077 ^T
CH-014, CH-017, CH-019, CH-024, CH-089, CH-090, CH-100	AF363640 (100 %)	<i>Rhodospiridium paludigenum</i> CBS6566 ^T
CH-055, CH-058, CH-144	DQ531941 (99.3 %)	<i>Rhodospiridium toruloides</i> CBS 5991
CH-026	EU669877 (100 %)	<i>Rhodotorula calyptogenae</i> strain 4107 CBS9125 ^T
CH-038	AF406911 (100 %)	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS 8987
CH-020	EU678938 (99.2 %)	<i>Rhodotorula</i> sp. B183
CH-011, CH-012, CH-013	DQ864974 (99.8 %)	<i>Ustilago sparsa</i>

นอกจากนี้ยังจำแนกได้เป็นแอสโคไมซีตัสยีสต์จำนวน 112 ไอโซเลท ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทราบสปีชีส์แล้ว 108 ไอโซเลท ใน 6 สกุล โดยยีสต์ที่แยกได้อยู่ในสกุลของ *Candida* ได้ถึง 6 สปีชีส์ ได้แก่ *C. nivariensis*, *C. orthopsilopsis*, *C. pseudohaemu-*

lonii, *C. tropicalis*, *C. thaimueangensis* และ *Candida* sp. และอยู่ในสกุล *Pichia* จำนวน 4 สปีชีส์ คือ *P. kudriavzevii*, *P. guilliermondii*, *P. maxicana*, และ *P. sydowiorum* และเป็นยีสต์ในสกุล *Aureobasidium*, *Brettanomyces*, *Debaryo-*

myces และ *Phaeoacremonium* สกุลละสปีชีส์ คือ *Aureobasidium pullulan*, *Brettanomyces naardensis*, *Debaryomyces nepalensis* และ *Phaeoacremonium rubrigenum* รวมเป็นแอสโคไมซีตัสยีสต์จำนวน 14 สปีชีส์ ดังแสดงใน Table 2 ในการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า *P. kudriavzevii* เป็นแอสโคไมซีตัสยีสต์ที่ถูกแยกได้มากถึง 39 ไอโซเลท จากตัวอย่างหลายชนิดที่เก็บจากป่าชายเลนหลาย ๆ จุดของการเก็บตัวอย่างด้วยกัน ไม่ว่าจะเป็นดิน ชากใบไม้จมเลน ขอนไม้ลอยน้ำ น้ำ ใบและดอก แสมดำ ใบแสมดำที่มีแมลงกัดแทะ รวมทั้งกิ่งไม้ เปลือก และรากหายใจของต้นโกงกาง รวมถึงใบไม้แห้งที่ตกหล่นอยู่ในบริเวณดังกล่าว อาจถือได้ว่า *P. kudriavzevii* เป็นยีสต์สปีชีส์ที่มีการกระจายและพบได้มากในป่าชายเลนบริเวณศูนย์ศึกษารวมชาติ และอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี และยังพบยีสต์ *Brettanomyces naardenensis* จำนวน 15 ไอโซเลท *Pichia guilliermondii* จำนวน 9 ไอโซเลท และ *Candida tropicalis* จำนวน 8 ไอโซเลท ซึ่งแอสโคไมซีตัสยีสต์เหล่านี้เคยมีรายงานมาก่อนแล้วว่าสามารถแยกได้จากตัวอย่างที่เก็บจากป่าชายเลน ตะกอนดินปากแม่น้ำ น้ำ พืช และสัตว์ที่เก็บจากทะเล (de Araujo *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 1997; Limtong *et al.*, 2007; Fell *et al.*, 2010; Limtong and Yongmanitchai, 2010; and Am-In *et al.*, 2011)

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของ rDNA ในการวิจัยนี้พิสูจน์ได้ว่าไอโซเลท CH-140, CH-141, CH-142 และ CH-143 ที่แยกจากตัวอย่างดินนั้นเป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกัน และเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ (new species) ที่มีความใกล้เคียงกับ *Candida naeodendra* โดยมี identities 99.2 เปอร์เซ็นต์ และมี substitutions 4 ตำแหน่ง เพื่อยืนยันผลการ

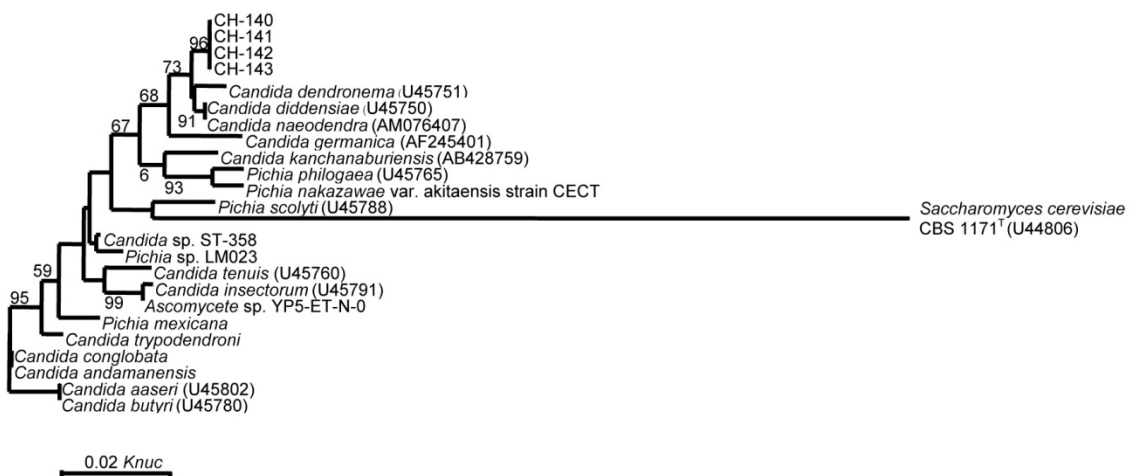
วิเคราะห์นิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ที่ระบุว่ายีสต์ทั้ง 4 ไอโซเลท เป็นสปีชีส์ใหม่ที่มีความใกล้เคียงกับ *Candida naeodendra* ผู้วิจัยจึงได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ ITS2 ซึ่งครอบคลุมบริเวณ 5.8S rDNA ของยีสต์ทั้ง 4 ไอโซเลท โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ 18S และ 28S rRNA gene ตามลำดับคือ pITSF (5'-GTC GTA ACA AGG TTA ACC TGC GG-3') และ pITSR (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 และ ITS2 บ่งชี้ว่ายีสต์ทั้ง 4 ไอโซเลท มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Candida naeodendra* (ซึ่งเปลี่ยนชื่อเป็น *Candida didensiae*) CBS6032^T, ITS Accession number: AY580316 พบว่ามี identities = 496/559 มี gap = 46/559 และมี substitutions = 17/559 คิดเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ Sugita และคณะ (1999) รายงานว่าถ้ายีสต์สองสายพันธุ์มีความแตกต่างบริเวณ ITS มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ถือว่าเป็นสปีชีส์ใหม่ ซึ่งผลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2, ITS1 และ ITS2 ยืนยันได้ว่ายีสต์ไอโซเลท CH-140, CH-141, CH-142 และ CH-143 เป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกัน และเป็นสปีชีส์ใหม่ในไฟลัมแอสโคไมซีตา สกุล *Candida* ที่มีความใกล้เคียงกับ *Candida naeodendra* ซึ่งความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีสต์ไอโซเลท CH-140, CH-141, CH-142 และ CH-143 ที่เป็นแอสโคไมซีตัสยีสต์สปีชีส์ใหม่ในสกุล *Candida* ที่มีความใกล้เคียงกับ *Candida naeodendra* ถูกแสดงด้วย phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นโดยวิธี neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) ตาม Kimura's two parameter system (Kimura, 1980) แสดงดัง Fig. 3

Table 2 Identification of 108 isolated yeast strains as known species in Ascomycota

Isolate	Accession number and % identities	Closest species
CH-006, CH-016, CH-025, CH-034, CH-035, CH-040	FJ515219 (100 %)	<i>Aureobasidium pullulans</i> strain SN22 ATCC62921 ^T
CH-015, CH-124, CH-125, CH-126, CH-127, CH-128, CH-129, CH-130, CH-131, CH-132, CH-133, CH-134, CH-135, CH-138, CH-139	AY969108 (100 %)	<i>Brettanomyces naardenensis</i> CBS6116 ^T
CH-044, CH-083, CH-084, CH-085, CH-086 CH-087	AF313362 (99.8 %)	<i>Candida nivariensis</i> strain UWOPS 98-110.4
CH-078, CH-080, CH-081, CH-091, CH-122, CH-123	FJ746056 (99.5 %)	<i>Candida orthopsilosis</i> strain ATCC 96139 CBS10906 ^T
CH-115	EF177490 (98.8 %)	<i>Candida pseudohaemulonii</i> strain AS 2.3240
CH-098, CH-119	FJ008045 (100 %)	<i>Candida</i> sp. AST2009b
CH-002, CH-079	FJ432617	<i>Candida thaimueangensis</i> strain S04-2.2 CBS10360 ^T
CH-003, CH-030, CH-031, CH-033, CH-051, CH-077, CH-097, CH-110	U45749	<i>Candida tropicalis</i> strain FWA-ZB3 CBS94 ^T
CH-108, CH-109, CH-111, CH-112, CH-113	U45839 (100 %)	<i>Debaryomyces nepalensis</i> CBS5921 ^T
CH-117, CH-118	AB278172 (100 %)	<i>Phaeoacremonium rubrigenum</i>
CH-036, CH-037, CH-039, CH-041, CH-043, CH-046, CH-047, CH-053, CH-088	FJ972213 (100 %)	<i>Pichia guilliermondii</i> strain TY09 CBS2030 ^T
CH-027, CH-028, CH-029, CH-042, CH-048, CH-049, CH-050, CH-052, CH-054, CH-056, CH-057, CH-059, CH-060, CH-061, CH-062, CH-063, CH-064, CH-065, CH-066, CH-067, CH-068, CH-069, CH-070, CH-071, CH-072, CH-073, CH-093, CH-094, CH-095, CH-096, CH-101, CH-103, CH-104, CH-105, CH-106, CH-107, CH-120, CH-136, CH-137	AB617989 (100 %)	<i>Pichia kudriavzevii</i> CBS5147 ^T
CH-032, CH-045, CH-074, CH-075, CH-076, CH-121	FM180550 (100 %)	<i>Pichia mexicana</i> CBS7066 ^T ATCC42175
CH-114	AB281329 (100 %)	<i>Pichia sydwiorum</i>

Table 3 Identification of CH-140, CH-141, CH-142 and CH-143 as the same species in a novel species in *Candida* closely related to *Candida naeodendra*

Isolate	Closest species	Identities (%)	Substitutions	Gaps
CH-140	<i>Candida naeodendra</i> ATCC56465 (U45759)	526/530 (99.2 %)	4	0
CH-141	<i>Candida naeodendra</i> CBS6032 (U45759)	526/530 (99.2 %)	4	0
CH-142	<i>Candida naeodendra</i> CBS6032 ^T (U45759)	526/530 (99.2 %)	4	0
CH-143	<i>Candida naeodendra</i> CBS6032 (U45759)	526/530 (99.2 %)	4	0

**Figure 3** Phylogenetic tree based on the sequences of the D1/D2 domain of 26S rRNA gene, showing positions of *Candida* sp. nov. (isolate CH-140, CH-141, CH-142 and CH-143) with respect to closely related species. The phylogenetic tree was constructed from evolutionary distance data corrected by two-parameter transformation of Kimura (1980), using the neighbor-joining method. Numbers indicate percentages of bootstrap sampling, derived from 1,000 samples.

4. สรุป

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่บริเวณ D1/D2 ของ rDNA ทำให้พิสูจน์ได้ว่ายีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างธรรมชาติที่เก็บจากป่าชายเลน บริเวณศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี จำนวน 135 ไอโซเลท โดยเป็นยีสต์ที่มีการอธิบายสปีชีส์มาแล้ว 131 ไอโซเลท ซึ่งเป็น

แบคทีเรียอิมยัคซีตัสยีสต์ 5 สกุล 8 สปีชีส์ คือ *Cryptococcus heveanensis*, *Pseudozyma hubeiensis*, *Rhodospiridium paludigenum*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula calyptogenae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula* sp. และ *Ustilago sparsa* และเป็นแอสโคไมยัคซีตัสยีสต์ใน 6 สกุล 14 สปีชีส์ คือ *Aureobasidium pullulan*, *Brettanomyces naardenensis*, *Candida nivariensis*, *C.*

orthopsilopsis, *C. pseudohaemulonii*, *C. tropicalis* *C. thaimueangensis*, *Candida* sp., *Debaryomyces nepalensis*, *Phaeoacremonium rubric-genum*, *Pichia kudriavzevii*, *P. guilliermondii*, *P. maxicana* และ *P. sydowiorum* ในบรรดา yeast ที่มีการอธิบายยีสต์มาก่อนหน้านี้ที่พบในการศึกษานี้พบว่า *P. kudriavzevii* เป็นยีสต์ที่มีการกระจายและพบมากบริเวณป่าชายเลนของศูนย์ศึกษาธรรมชาติและอนุรักษ์ป่าชายเลนเพื่อการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ จังหวัดชลบุรี ส่วนยีสต์อีก 4 ไอโซเลท คือ CH-140, CH-141, CH-142 และ CH-143 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินนั้นถูกพิสูจน์โดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1, ITS2 และ 5.8S rDNA ทำให้พิสูจน์ได้ว่าเป็นแอสโคไมยซีตัสยีสต์สปีชีส์ใหม่ในสกุล *Candida* ที่มีความใกล้เคียงกับ *Candida naeodendra* ทั้งนี้ผู้วิจัยกำลังจัดเตรียมข้อมูลเพื่อใช้ในการอธิบายลักษณะของยีสต์สปีชีส์ใหม่ และเผยแพร่ข้อมูลในระดับสากลเพื่อเป็นการบันทึกลงในฐานข้อมูลทางชีวภาพต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ขอขอบคุณหน่วยทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม จังหวัดชลบุรีในความอนุเคราะห์การเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณคุณวัฒน์ เกตุสวัสดิวงศ์ คุณวรวัฒน์ สุราฤทธิ์ ในงานเก็บตัวอย่างภาคสนามที่มีส่วนให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, J.Z., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J.,

1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

Am-In, S., Limtong, S., Yongmanitchai, W. and Jindamorakot, S., 2011, *Candida andamanensis* sp. nov., *Candida laemsonensis* sp. nov. and *Candida ranongensis* sp. nov., anamorphic yeast species isolated from estuarine waters in a Thai mangrove forest, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 454-461.

Am-In, S., Yongmanitchai, W. and Limtong, S., 2008, *Kluyveromyces siamensis* sp. Nov., a novel ascomycetous yeast species isolated from water in mangrove forest in Ranong Province, Thailand, *FEMS Yeast Res.* 8: 823-828.

de Araujo, F.V., Soares, C.A., Hagler, A.N. and Mendonça-Hagler, L.C., 1995, Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a southeast Brazilian mangrove ecosystem, *Antonie Van Leeuwenhoek* 68: 91-99.

Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P. and Panijpan, B., 2007, Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*), *Biol. Cont.* 42: 326-335.

Fell, J.W., Statzell-Tallman, A., Scorzetti, G. and Gutierrez, M.H., 2010, Five new species of yeasts from fresh water and

- marine habitats in the Florida Everglades, *Antonie van Leeuwenhoek* 99: 533–549.
- Felsenstein, J., 1985, Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap, *Evolution* 39: 738-791.
- Kimura, M., 1980, A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kurtzman, C.P., 1992, rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeasts, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 1-6.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J., 1998, Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences, *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371.
- Kutty, S.N. and Philip, R., 2008, Marine yeasts: A review, *Yeast* 25: 465-483.
- Limtong, S. and Yongmanitchai, W., 2010, *Candida chanthaburiensis* sp. nov., *Candida kungkrabaensis* sp. nov. and *Candida suratensis* sp. nov., three novel yeast species from decaying plant materials submerged in water of mangrove forests, *Antonie van Leeuwenhoek* 98: 379-388.
- Limtong, S., Yongmanitchai, W., Kawasaki, H. and Seki, T., 2007, *Candida thaimueangensis* sp. nov., an anamorphic yeast species from estuarine water in a mangrove forest in Thailand, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 650-653.
- Limtong, S., Youngmanitchai, W., Kawasaki, H. and Seki, T., 2008, *Candida phangngensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the *Yarrowia* clade, isolated from water in mangrove forests in Phang-Nga Province, Thailand, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 515-519.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, pp. 150-172, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York.
- Masuda, K., Guo, X.F., Uryu, N., Hagiwara, T. and Watabe, S., 2008, Isolation of marine yeasts collected from the pacific ocean showing a high production of γ -aminobutyric acid, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 3265-3272.
- Nagahama, T., Hamamoto, M., Nakase, T. and Horikoshi, K., 2003, *Rhodotorula benthica* sp. nov. and *Rhodotorula calyptogenae* sp. nov., novel yeast species from animals collected from the deep-sea floor, and *Rhodotorula lysiniphila* sp. nov., which is related phylogenetically, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 897-903.
- Nitiyon, S., Boonmak, C., Am-In, S., Jindamorakot, S., Kawasaki, H., Yongmanitchai, W. and Limtong, S., 2011, *Candida saraburiensis* sp. nov. and *Candida prachuapensis* sp. nov., xylose-utilizing yeast species isolated in Thailand, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 462-468.

- Saitou, N. and Nei, M., 1987, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Soares, C.A.G., Maury, M., Pagnocca, F.C., Araujo, F.V., Mendonra-Hagler, L.C. and Hagler, A.N., 1997, Ascomycetous yeasts from tropical intertidal dark mud of south-east Brazilian estuaries, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43: 265-272.
- Statzell, T.A., Belloch, C. and Fell, J.W., 2008, *Kwoniella mangroviensis* gen. nov., sp. nov. (Tremellales, Basidiomycota), a teleomorphic yeast from mangrove habitats in the Florida Everglades and Bahamas, *FEMS Yeast Res.* 8: 103-113.
- Sugita, T., Nishikawa, A., Ikeda, R. and Shinoda, T., 1999, Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification, *J. Clin. Microbiol.* 37: 1985-1993.
- Wang, Q.M., Jia, H.J. and Bai, F.Y., 2006, *Pseudozyma hubeiensis* sp. nov. and *Pseudozyma shanxiensis* sp. nov., novel ustilaginomycetous anamorphic yeast species from plant leaves, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 289-293.