



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

อนุกรมวิธานและฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนมัยซีทจากดินป่าพรุในจังหวัดระยอง

Taxonomy and Antimicrobial Activity of Actinomycetes from Peat

Swamp Forest Soil in Rayong province

โดย

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

คณิต สุวรรณบริรักษ์

สิงหาคม 2557

ชื่อโครงการวิจัย : อนุกรมวิธานและฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนมัยสีทจากดินป่าพรุในจังหวัดระยอง

ชื่อผู้วิจัย : ศ. ดร.สมบุญ ธนาศุภวัฒน์

: อ. ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์

เดือนปีที่ทำวิจัยเสร็จ: สิงหาคม 2557

บทคัดย่อ

การศึกษาอนุกรมวิธานของแอคติโนมัยสีททั้งหมด 77 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินป่าพรุในจังหวัดระยองจำนวน 16 ตัวอย่าง พบว่าแอคติโนมัยสีทที่คัดแยกได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 9 สกุล คือ สกุล *Streptomyces* 35 ไอโซเลต สกุล *Micromonospora* 3 ไอโซเลต สกุล *Microbispora* 9 ไอโซเลต สกุล *Microtetraspora* 6 ไอโซเลต สกุล *Actinomadura* 2 ไอโซเลต สกุล *Nocardia* 4 ไอโซเลต สกุล *Actinoallomurus* 1 ไอโซเลต สกุล *Dactylosporangium* 3 ไอโซเลต *Nonomuraea* 1 ไอโซเลต และเป็นแอคติโนมัยสีทที่ไม่สามารถจำแนกได้อีกจำนวน 13 ไอโซเลต จากการศึกษาลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของตัวแทนไอโซเลตในแต่ละสกุล พบว่าแอคติโนมัยสีทไอโซเลต RY35-23 และ RY35-68 เป็นแอคติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene เป็น 98.94 และ 97.5 % เมื่อเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน จึงได้เสนอตั้งชื่อว่า *Dactylosporangium sucinum* RY35-23^T และ *Actinomadura rayongensis* RY35-68^T ตามลำดับ จากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ พบว่ามีแอคติโนมัยสีทจำนวน 41 ไอโซเลตแสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพที่นำมาทดสอบ โดยแอคติโนมัยสีทส่วนใหญ่ที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพเป็นสกุล *Streptomyces* จำนวน 25 ไอโซเลต สกุล *Micromonospora* 1 ไอโซเลต สกุล *Microtetraspora* 1 ไอโซเลต สกุล *Microbispora* 1 ไอโซเลต สกุล *Dactylosporangium* 2 ไอโซเลต สกุล *Actinoallomurus* 1 ไอโซเลต และ Unknown species 5 ไอโซเลต จากการศึกษา สารสกัดยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ดีที่สุด โดยการแยกองค์ประกอบด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีและวิเคราะห์โดยเทคนิค liquid chromatography mass spectrometry พบว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกคือ Actinomycin D และจากการศึกษา 16S rRNA gene ของไอโซเลต RCU-197 พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะเป็นแอคติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ที่จำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมอีก

Project Title : Taxonomy and Antimicrobial Activity of Actinomycetes from Peat Swamp Forest Soil in Rayong province

Name of the Investigators : Professor Dr. Somboon Tanasupawat

: Dr. Khanit Suwanborirux

Month/Year : August 2014

ABSTRACT

A taxonomic study on 77 actinomycete isolates from 16 peat swamp forest soils samples collected in Rayong Province was carried out. The actinomycete isolates were divided in 9 genera including *Streptomyces* (35 isolates), *Micromonospora* (3 isolates), *Microbispora* (9 isolates), *Microtetraspora* (6 isolates), *Actinomadura* (2 isolates), *Nocardia* (4 isolates), *Actinoallomurus* (1 isolate), *Dactylosporangium* (3 isolates) and unknown species (13 isolates) based on their morphology. On the basis of 16S rRNA gene sequence analyses for the representative isolates and the polyphasic approach, the novel species, isolate RY35-23 and RY35-68 were closely related to the type strains with 98.94 and 97.5 % 16S rRNA gene sequence similarity. The name *Dactylosporangium succinum* and *Actinomadura rayongensis* were proposed for them, respectively. In the screening of antimicrobial activities of the isolated actinomycetes 41 isolates in genera *Streptomyces* (25 isolates), *Micromonospora* (1 isolate), *Microtetraspora* (1 isolate), *Microbispora* (1 isolate), *Dactylosporangium* (2 isolates), *Actinoallomurus* (1 isolate) and unknown species (5 isolates) showed antimicrobial activities against tested microorganisms. Chromatographic and liquid chromatography/mass spectrometry revealed that isolate RCU-197 produced actinomycin D as the active compound against Gram-positive bacteria. Based on 16S rRNA gene sequence analyses, isolate RCU-197 showed the characteristics of the novel actinomycete species that it is required for further study.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ โดยอนุมัติทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2555-56 เป็นเงินจำนวนทั้งสิ้น 245,000 บาท (สองแสนสี่หมื่นห้าพัน บาทถ้วน)

ขอขอบคุณศูนย์ปฏิบัติการกลาง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาตให้ใช้เครื่องมือ รวมทั้งภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ใช้สถานที่ในการวิจัย ครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า	
บทคัดย่อภาษาไทย	I	
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II	
กิตติกรรมประกาศ	III	
สารบัญ	IV	
สารบัญตาราง	V	
สารบัญภาพ	VI	
บทที่ 1 บทนำ	1	
บทที่ 2 การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3	
บทที่ 3 วิธีการวิจัย		
	การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกแอสคิตินอิมยีส	9
	การหมักเพื่อผลิตสารทุติยภูมิ	10
	การสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมัก	10
	ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น	10
	การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบ	11
	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแอสคิตินอิมยีส	11
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล		
	ผลการแยกแบคทีเรียแอสคิตินอิมยีสจากตัวอย่างดินป่าพรุ	14
	ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแอสคิตินอิมยีส	14

	ผลการคัดเลือกแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ	16
	ผลการศึกษาแอกติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่	46
บทที่ 5	ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	52
	เอกสารอ้างอิง	55
	ภาคผนวก	
	อาหารเลี้ยงเชื้อ	59
	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือก	62

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Sample number, pH and actinomycete isolates	18
2	Cultural characteristic of actinomycete isolates on ISP2 agar	19
3	Phenotypic characteristics of actinomycete isolates and antimicrobial activity	24
4	Carbon utilization of selected actinomycete isolates	31
5	16S rRNA gene sequence similarity (%) of isolates and closest actinomycete strain	33
6	Candidate of novel species	34
7	Antimicrobial activity of crude ethyl acetate extract of selected actinomycete isolates	35
8	Cellular fatty acid compositions (%) of strain RY35-23 ^T and closely related <i>Dactylosporangium</i> species.	48
9	Differential characteristics between strain RY35-23 ^T and closely related type strains of <i>Dactylosporangium</i> species	49
10	Cellular fatty acid compositions (%) of strain RY35-68 ^T and <i>Actinomadura atramentaria</i> JCM 6250 ^T	52
11	Differential characteristics between strain RY35-68 ^T and <i>A. atramentaria</i> JCM 6250 ^T	53

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	Scanning electron micrograph of <i>Streptomyces</i> strains	36
2	Scanning electron micrograph of <i>Microbispora</i> strains	37
3	Scanning electron micrograph of <i>Microtetraspora</i> strains	38
4	Scanning electron micrograph of <i>Actinoallomurus</i> sp. RY9-5	38
5	Scanning electron micrograph of <i>Dactylosporangium</i> sp. RY35-2	39
6	Scanning electron micrograph of <i>Actinomadura</i> sp. RY35-68	39
7	Neighbor-Joining Phylogenetic tree based on the almost complete 16S rRNA gene sequence of <i>Streptomyces</i> isolates.	40
8	Neighbor-Joining Phylogenetic tree based on the almost complete 16S rRNA gene sequence of rare actinomycete isolates	41
9	Neighbor-Joining phylogenetic tree based on the almost complete 16S rRNA gene sequence of isolate RY9-5	42
10	Isolation scheme of antibacterial compound from isolate RCU-197	43
11	Antibacterial activities of separated fraction of Isolate RCU-197	44
12	Mass spectrum ของสารสกัดใน fraction 100% methanol ของ <i>Streptomyces</i> sp. RCU-197	45
13	Phylogenetic relationships based on neighbor-joining analysis of 16S rRNA gene sequences of strain RY35-23 ^T and all members in the genus <i>Dactylosporangium</i> .	46
14	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ไอโซเลต RY35-68 ^T กับสายพันธุ์ <i>Actinomadura</i> species อื่นๆ	51

บทที่ 1

บทนำ

แอกติโนมัยสียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถสร้างเส้นใย (mycelium) เป็นสายยาวซึ่งส่วนใหญ่สามารถสร้างได้ทั้งเส้นใยใต้ผิวอาหาร (Substrate mycelium) และเส้นใยเหนือผิวอาหาร (aerial mycelium) เป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณ G+C 55-78 โมล% ซึ่งสูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป แอกติโนมัยสียมีความสำคัญ คือ สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ จากข้อมูลล่าสุดพบว่าสารปฏิชีวนะส่วนใหญ่สร้างมาจากแอกติโนมัยสีย (45%) เชื้อรา (38%) และแบคทีเรียชนิดอื่น (17%) โดยจุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยสียสกุล *Streptomyces* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะได้มากที่สุด 70% (ประมาณ 8,000 ชนิด) ของสารปฏิชีวนะที่สร้างจากแอกติโนมัยสียทั้งหมด แบคทีเรียสกุล *Micromonospora* ผลิตได้ 5% (740 ชนิด) นอกเหนือจากนี้ผลิตได้จากแบคทีเรียในสกุลอื่น เช่น *Streptoverticillium*, *Kitasatospora*, *Actinomadura*, *Saccharothrix*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Nonomuria*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Amycalotopsis*, *Kibdellosporangium*, *Pseudonocardia*, *Actinosporangium*, *Streptosporangium*, *Spirillospora*, *Planobispora*, *Planomonospora* เป็นต้น (Bérdy, 2005)

ป่าพรุ (Peat Swamp forest) เป็นป่าที่เป็นที่ลุ่มชุ่มน้ำหรือมีน้ำจืดแช่ขังขึ้นอยู่ในพื้นที่เป็นแอ่งรูปกระทะ ได้รับความน้ำจากฝนเป็นส่วนใหญ่ทำให้มีน้ำจืดแช่ขังตลอดปี มีซากพืชทับถมกันเป็นเวลานานโดยผุสลายเข้ามา และมักขังติดต่อกันเป็นเวลานาน อาจมีการแห้งแล้งในบางครั้งแต่ดินยังคงชื้นจัด มีซากพืชของพืชทับถมหนา เวลาเหยียบมีความหยุ่น สภาพดินพรุมีการทับถมของซากพืช เรียกว่า ดินอินทรีย์ (organic soils) หรือดินชุดนราธิวาส (Narathiwat series) ซากอินทรีย์วัตถุที่ทับถมถ้าหากสลายหมดจนไม่เห็นซากพืชเรียก มัค (muck) ถ้าสลายไม่หมดมองเห็นซากพืชเรียก พีท (peat) ดินพรุส่วนใหญ่หนามากกว่า 40 เซนติเมตร บางแห่งอาจถึง 2 เมตร มีสีดำหรือน้ำตาลแก่ ดินเป็นกรดปานกลางในชั้นบนและกรดจัดในชั้นล่าง ตามปกติค่าความเป็นกรด-ด่างของดินจะแปรผันอยู่ในช่วง 4.5-6.0 ซึ่งลักษณะการทับถมของอินทรีย์สารจำนวนมากในป่าพรุ ผู้วิจัยจึงคาดว่าป่าพรุน่าจะเป็นแหล่งที่สามารถพบจุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนมัยสียที่มีความหลากหลายเป็นจำนวนมากและคาดว่าน่าจะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญจากจุลินทรีย์แอกติโนมัยสียที่น่าสนใจ

พื้นที่ป่าพรุหนองจำรุง ตั้งอยู่ตำบลชากพง อำเภอกแสลง จังหวัดระยอง มีเนื้อที่ประมาณ 3,809 ไร่ จากข้อมูลสำนักนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมสภาพป่าพรุหนองจำรุงเป็นพื้นที่ลุ่มที่มีน้ำขังประเภทป่าพรุในที่ลุ่มหลังสันทราย มีลักษณะความเป็นป่าพรุที่สมบูรณ์และเป็นพื้นที่ที่ยังไม่มีการสำรวจเกี่ยวกับความหลากหลายและชนิดของจุลินทรีย์ในกลุ่มแอกติโนมัยสีย

ในการศึกษาครั้งนี้จะเก็บตัวอย่างดินจากป่าพรุหนองจำรุง ในจังหวัดระยอง แล้วทำการแยกแบคทีเรียแอกติโนมัยสียเพื่อศึกษาอนุกรมวิธานในระดับสกุลและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสายพันธุ์แอกติโนมัยสียที่

แยกได้ ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการศึกษาต่อทางด้านเภสัชศาสตร์ เพื่อนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยสีทจากดินป่าพรุในจังหวัดระยองที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ
2. เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดยับยั้งจากการหมักของแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้

บทที่ 2

การสำรวจแนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จุลินทรีย์กลุ่มแอกติโนมัยสีทเป็น แบคทีเรียแกรมบวก เซลล์แตกกิ่งก้านสาขาและมีลักษณะโคโลนิ คล้ายเชื้อรา แต่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส จึงจัดเป็น prokaryote ผนังเซลล์ประกอบด้วย muramic acid และ diaminopimelic acid ซึ่งต่างจากผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งประกอบไปด้วย chitin และ glucans แอกติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่พบได้ในดินทั่วไป พบว่าจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในดินร้อยละ 10-50 คือแอกติโนมัยสีท นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ตามกองปุ๋ยหมักหรือวัตถุเน่าเปื่อย ดินตะกอนใต้น้ำ ใต้ทะเลสาบ ทั้งในดินชั้นบนและดินชั้นล่างหรือแม้แต่ในส่วนลึกของหน้าดิน ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรของแอกติโนมัยสีท ได้แก่ ลักษณะทางกายภาพของดิน ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และความเป็นกรด-ด่างของดิน (Goodfellow and Williams, 1983)

การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแอกติโนมัยสีทในระดับสกุล อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomic characteristics) (ตาราง A) เช่น cell wall chemotype, whole-cell sugar, phospholipid type ตลอดจน diaminopimelic acid type ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อนั้นๆ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคในระดับโมเลกุล ได้แก่ การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene และ Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) รวมทั้งการนำระบบ bioinformatic มาช่วยตัดสินในการจัดอนุกรมวิธานให้ถูกต้องและแม่นยำขึ้น

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับแอกติโนมัยสีทจากป่าพรุในประเทศไทยพบว่าในปี 2004 จิตติ ท่าวัว ได้ศึกษาแอกติโนมัยสีทจากดินป่าพรุจังหวัดตรัง พัทลุง ยะลา และนราธิวาส พบว่าสามารถแยกแอกติโนมัยสีทที่สร้างสปอร์เดี่ยวบนเส้นใยในสกุล *Micromonospora* ได้จำนวน 52 ไอโซเลต และพบ *Micromonospora* สปีชีส์ใหม่ ได้แก่ *Micromonospora eburnea* (Thawai et al., 2005), *Micromonospora aurantionigra* (Thawai et al., 2004) *Micromonospora siamensis* (Thawai et al., 2005) และ *Micromonospora narathiwatensis* (Thawai et al., 2007) ตามลำดับ และได้พบสารกลุ่ม polyene macrolide lactam ชนิดใหม่คือ Micromonosporin A (9,11,13-trihydroxy-14,19,24-trimethyl-1-azacyclotetracosan-3, 5,7,15,17,19,21-heptaen-2-one) และมีการสร้างสารอนุพันธ์คือ 9,11,13-trihydroxy-14,19,24-trimethyl-1-azacyclotetracosan-2-one โดยสารอนุพันธ์ที่เตรียมได้แสดงฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์อย่างอ่อน และแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* (K1, multidrug-resistant strain) ที่ระดับ $IC_{50} = 3.1$ microgram/mL และเชื้อวัณโรคที่ระดับ MIC = 50 microgram/mL.

การค้นพบเชื้อแอกติโนมัยสีทสกุลใหม่ (new genus) ในปี 2006 ได้มีการแยกแอกติโนมัยสีทจากดินป่าพรุในจังหวัดพัทลุงและได้มีการค้นพบแอกติโนมัยสีทสกุลใหม่คือ *Actinocatenispora* และมีการตั้งชื่อว่า

Actinocatenispora thailandica (Thawai et al., 2006) ต่อมาในปี 2010 ได้มีการค้นพบแอสโคไมซีตสกุลใหม่อีกคือ *Actinaurispora* และตั้งชื่อว่า *Actinaurispora siamensis* (Thawai et al., 2010)

ในปี 2011 ได้มีการตีพิมพ์การค้นพบแอสโคไมซีตชนิดใหม่จากป่าพรุในอุทยานแห่งชาติภูซาง จังหวัดพะเยา และตั้งชื่อว่า *Micromonospora humi* (Songsumanus et al., 2011) จะเห็นได้ว่าป่าพรุของประเทศไทยมีความอุดมสมบูรณ์ทางทรัพยากรจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มแอสโคไมซีตเป็นอย่างมาก ดังนั้นโอกาสที่จะพบเชื้อแอสโคไมซีตสายพันธุ์ใหม่จึงมีค่อนข้างสูง และเนื่องจากเชื้อแอสโคไมซีตเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างสารปฏิชีวนะที่มีความหลากหลาย (ตาราง B-D) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจจากเชื้อสายพันธุ์ใหม่ด้วย ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นศึกษาการกระจายตัวของเชื้อแอสโคไมซีตที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากป่าพรุหนองจำรุง จังหวัดระยอง เพื่อนำมาศึกษาอนุกรมวิธานในการพิสูจน์เอกลักษณ์แอสโคไมซีตไอโซเลตที่น่าสนใจในระดับสปีชีส์ และศึกษาสารทุติยภูมิที่ผลิตจากไอโซเลตดังกล่าว ตลอดจนทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพเบื้องต้นของสารทุติยภูมินั้น ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการศึกษาทางจุลชีววิทยาและเภสัชศาสตร์ เพื่อใช้ประโยชน์ทางวิทยาศาสตร์สาธารณสุขต่อไป

ตารางA ลักษณะความแตกต่างระดับสกุลของแอคติโนมัยสีท

Genus	Typical morphology	Wall chemotype	Sugar pattern*	Phospholipid type**
<i>Streptomyces</i>	Chains of spores on aerial hyphae	I	-	PII
<i>Micromonospora</i>	Branched, non-fragmenting hyphae, aerial hyphae scanty or absent	II	D	PII
<i>Actinoplanes</i>	Branched, non-fragmenting hyphae, aerial hyphae scanty or absent	II	D	PII
<i>Nocardia</i>	Unbranched-branched fragmenting susstrate and aerial hyphae	IV	A	PII
<i>Actinomyces</i>	Cocci-irregular rods-branching	V, VI	-	PII
<i>Thermomonospora</i>	Single spores often in cluster	III	C	PIV
<i>Actinomadura</i>	Short chains of arthrospores	III	B	PI
<i>Streptosporangium</i> and <i>Microtetraspora</i>	Stable substrate and aerial mycelium	III	B and C	PIV
<i>Frankia</i>	Multilocular sporangia	III	B,C,E	PI
<i>Nocardioides</i>	Branching, fragmenting mycelium with aerial hyphae	I	-	PI
<i>Actinobiapora</i>	Pairs of spores on substrate	IV	*	PIV
<i>Glycomyces</i>	Short spore chains on aerial hyphae	II	D	PI
<i>Intrasporangium</i>	Fragmenting, branching mycelium	I	-	PI
<i>Kibdelosporangium</i>	Aerial sporangium-like structures	IV	A	PII
<i>Kineosporia</i>	Substrate mycelium	I	-	PIII
<i>Nocardiopsis</i>	Fragmenting hypae	III	C	PIII
<i>Sporichthya</i>	Aerial mycelium, motile spores	I	-	ND

*Sugar pattern A comprising arabinose, galactose and xylose; pattern B, madurose and no arabinose and xylose; pattern C, no diagnostic sugar; pattern D, xylose and arabinose as diagnostic sugar.

**Phospholipid type PI, no nitrogenous phospholipids; type PII, contain only one nitrogenous phospholipid; type PIII, phosphatidyl choline as character; PIV contain unknown phospholipid containing glucosamine.

ND, not determined

ตารางB จำนวนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากแอคติโนมัยซีท (Berdy, 2005)

Streptomycetaceae:		Thermomonosporaceae:	
<i>Streptomyces</i>	8000	<i>Actinomadura</i>	345
<i>Streptoverticillium</i>	258	<i>Saccharothrix</i>	68
<i>Kitasatospora</i>	37	<i>Microbispora</i>	54
<i>Chainia</i>	30	<i>Actinosynnema</i>	51
<i>Microellbospora</i>	11	<i>Nocardiosis</i>	41
<i>Nocardioides</i>	9	<i>Microtetrastora/Nonomuria</i>	26/21
		<i>Thermomonospora</i>	19
Micromonosporaceae:		<i>Micropolyspora/Faenia</i>	13/3
<i>Micromonospora</i>	740	<i>Thermoactinomyces</i>	14
<i>Actinoplanes</i>	248		
<i>Dactylosporantium</i>	58	Mycobacteriaceae:	
<i>Ampullariella</i>	9	<i>Nocardia</i>	357
<i>Glycomyces</i>	2	<i>Mycobacterium</i>	57
<i>Catenuloplanes</i>	3	<i>Arthrobacter</i>	25
<i>Catellatospora</i>	1	<i>Brevibacterium</i>	17
		<i>Proactinomyces</i>	14
Pseudonocardiaceae:		<i>Rhodococcus</i>	13
<i>Saccharopolyspora</i>	131		
<i>Amycalotopsis/Nocardia</i>	120/357	Other species:	
<i>Kibdellosporantium</i>	34	<i>Actinosporantium</i>	30
<i>Pseudonocardia</i>	27	<i>Microellbospora</i>	11
<i>Amycolatopsis</i>	12	<i>Frankia</i>	7
		<i>Westerdykella</i>	6
Streptosporangiaceae:		<i>Kitasatoa</i>	5
<i>Streptosporantium</i>	79	<i>Synnenomyces</i>	4
<i>Streptoalloteichus</i>	48	<i>Sebekia</i>	3
<i>Spirillospora</i>	11	<i>Elaktomyces</i>	3
<i>Planobispora</i>	10	<i>Excelsospora</i>	3
<i>Kutzneria</i>	4	<i>Waksmania</i>	3

ตารางที่ C สารปฏิชีวนะที่ได้จากแอคติโนมัยซีทในสกุล *Streptomyces*

Compounds	Strains	Activity	References
Actamycin	<i>Streptomyces</i> sp. E/784	Antibacterial activity	Hooper and Rickards, 1998
Actinomycin Z	<i>S. fradiae</i>	Antimicrobial activity against <i>B. subtilis</i> ATCC 6051	Lackner <i>et al.</i> , 2000
Bagremycin A and B	<i>Streptomyces</i> sp. Tu 4128	Moderate activity against gram-positive bacteria and some fungi	Bertasso <i>et al.</i> , 2002
Benzantraquinone YM-181741	<i>Streptomyces</i> sp. Q 57219	Selective activity against <i>Helicobacter pylori</i>	Taniguchi <i>et al.</i> , 2002
Cedarmycins A and B	<i>Streptomyces</i> sp. TP-AO 456	Antibiotic activity against gram-positive and negative bacteria and yeasts	Sasaki <i>et al.</i> , 2002a
Creminycin	<i>Streptomyces</i> sp. MJ 635-86F5	Broad antimicrobial activity against gram-positive bacteria including methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Igarashi <i>et al.</i> , 1998
Cyclomarin A, B and C	<i>Streptomyces</i> sp. CNB-982	Potent antiinflammatory activity	Renner <i>et al.</i> , 1999
Demethyl mutactimycins	<i>Streptomyces</i> sp. GW 60/1571	Moderate antimicrobial activity against gram-positive bacteria	Speitling <i>et al.</i> , 1998
5'- and 7'- demethylnovobiocin	<i>Streptomyces</i> sp. TP-A0556	Antibiotic activity against gram-positive and negative bacteria	Sasaki <i>et al.</i> , 2001
Dihydrophencomycin	<i>Streptomyces</i> sp. B8251	Weakly antimicrobial activity	Puseker <i>et al.</i> , 1997
(E)-4-Oxonon-2-enoic acid	<i>S. olivaceus</i>	Antibacterial activity against gram-positive and negative bacteria	Ballini and Bosica, 1998
Enterocin	<i>Streptomyces</i> sp. BD-26T	Bacteriostatic against gram-positive and gram-negative bacteria	Sitachitta, Gadepalli and Davidson, 1996
Feigrisolide B	<i>Streptomyces griseus</i>	Strong antibacterial activity, as well as medium cytotoxic and antiviral activity	Tang <i>et al.</i> , 2000
Lactonamycin	<i>Streptomyces rishiriensis</i> MJ 773-88K4	Antimicrobial activity against gram-positive bacteria including MRSA and vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i> (VRE)	Matsumoto <i>et al.</i> , 1999
Mathemycin B	<i>Streptomyces</i> sp.	Antimicrobial activity against <i>Fusarium culmorum</i>	Mukhopadhyay 1999
2-Methyl-heptyl isonicotinate	<i>Streptomyces</i> sp. 201	Antimicrobial activity against <i>B. subtilis</i> , <i>Shigella</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> and the pathogenic fungi	Bordoloi <i>et al.</i> , 2002
Methylsulfomycin I	<i>Streptomyces</i> sp. HLI Y-9420704	Antimicrobial activity against a wide range of gram-positive bacteria including MRSA and vancomycin and teicoplanin resistant strain	Vijaya-Kumar, 1999
(E)-4-Oxonon-2-enoic acid	<i>S. olivaceus</i>	Antibacterial activity against gram-positive and negative bacteria	Ballini and Bosica, 1998
Enterocin	<i>Streptomyces</i> sp. BD-26T	Bacteriostatic against gram-positive and gram-negative bacteria	Sitachitta, Gadepalli and Davidson, 1996
Feigrisolide B	<i>Streptomyces griseus</i>	Strong antibacterial activity, as well as medium cytotoxic and antiviral activity	Tang <i>et al.</i> , 2000
Lactonamycin	<i>Streptomyces rishiriensis</i> MJ 773-88K4	Antimicrobial activity against gram-positive bacteria including MRSA and vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i>	Matsumoto <i>et al.</i> , 1999
Mathemycin B	<i>Streptomyces</i> sp.	Antimicrobial activity against <i>Fusarium culmorum</i>	Mukhopadhyay 1999
2-Methyl-heptyl isonicotinate	<i>Streptomyces</i> sp. 201	Antimicrobial activity against <i>B. subtilis</i> , <i>Shigella</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> and the pathogenic fungi	Bordoloi <i>et al.</i> , 2002
Methylsulfomycin I	<i>Streptomyces</i> sp. HLI Y-9420704	Antimicrobial activity against a wide range of gram-positive bacteria including MRSA and vancomycin and teicoplanin resistant strain	Vijaya-Kumar, 1999

ตารางD สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพของแอสโคดีโนมัยซีทส์ที่หายากสกุล *Micromonospora* และ *Microbispora*

Compounds	Strains	Activity	References
Anthraquinone	<i>M. lupini</i>	Antitumor activity	Igarashi <i>et al.</i> (2007)
Retymicin,	<i>Micromonospora</i> sp.Tu6368	Cytotoxic activity	Antal <i>et al.</i> (2005)
Galtamycin B,			
Saquayamycin Z,			
Ribofuranosyllumichrome,	<i>Micromonospora</i> sp. TP-A0468	Antitumor activity	Furumai <i>et al.</i> (2002)
Kosinostatin	<i>Micromonospora</i> sp.	Gastrulation	Ohta <i>et al.</i> (2001)
Micromonosporide A	<i>Micromonospora</i> sp. L-25-ES25-008	inhibitor	Chimeno <i>et</i>
IB-96212	<i>Micromonospora</i> sp. SB-219383	Cytotoxic activity	<i>al.</i> (2000)
SB-219383		Tyrosyl tRNA	Stefansky <i>et</i>
	<i>Micromonospora</i> sp. TP-A0316	synthetase inhibitor	<i>al.</i> (2000)
Arisostatin A and B	<i>Micromonospora</i> sp.MA7094	Antibacterial activity	
Rusmicin	<i>Micromonospora</i> sp. SA246	Antifungal activity	Igarashi <i>et al.</i> (2000)
GTRI-02		Lipid peroxidation	Sidmund <i>et</i>
	<i>M. carbonacea</i>	inhibitor	<i>al.</i> (1998)
1-Hydroxycrisamicin A		Antibacterial activity	Yeo <i>et al.</i> (1998)
Thiostepton	<i>M. echinospora</i> subsp.		
YM-47515	<i>echinospora</i>	Antimicrobial	Puar <i>et al.</i> (1997)
Thiocoraline	<i>Micromonospora</i> sp. L-13-ACM2-	activity	
Microbiaeratin (Sulphur-	092	Antimicrobial	Sugawara <i>et</i>
containing indole	<i>Mb. aerate</i> IMBAS-11A	activity	<i>al.</i> (1997)
alkaloids)		Anti-MRSA activity	Romero <i>et al.</i> (1997)
Bispolides	<i>Microbispora</i> sp. A34030		Ivanova <i>et al.</i> (2007)
		Tyrosine kinase	
Hibarimicins B	<i>Mb. rosea</i> subsp. <i>hibaria</i>	inhibitors	Okujo <i>et al.</i> (2007)
		Weak antimicrobial	
		activity	Sung <i>et al.</i> (2002)

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง การแยกและการคัดเลือกแอคติโนมัยสีท

3.1.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่เก็บ ได้แก่ ดินในบริเวณป่าพรุหนองจำรุง โดยเก็บลึกลงไปจากผิวดินประมาณ 1 – 10 เซนติเมตรใส่ในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิทและรักษาตัวอย่างไว้ในอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งถึงกระบวนการคัดแยก

3.1.2 การเตรียมตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินที่เก็บได้มาเตรียมก่อนการแยกเชื้อ (pretreatment) โดยแต่ละตัวอย่างจะแบ่งออกเป็นสามส่วนและเตรียมโดยวิธี ผึ่งให้แห้ง, Heat treatment (Nonomura, 1969) และ Phenol treatment (Hayakawa et al., 1991)

3.1.3 การแยกแบคทีเรียแอคติโนมัยสีท

การแยก ใช้เทคนิค spread plate (Tortora et al., 1995) โดยนำตัวอย่างดิน 1 กรัมใส่ในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดย Vortex 1 นาที และนำมาเจือจางต่อให้มีความเจือจาง 1:1,000 – 1:10,000 จุดสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรเกลี่ยบนอาหาร HV agar, AV agar และ starch-casein nitrate agar ที่ผสมสารปฏิชีวนะ ได้แก่ nalixidic acid และ nystatin หรือ cycloheximide ความเข้มข้น 25 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบและเชื้อราตามลำดับ บ่มงานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 3-4 สัปดาห์ เลือกเก็บโคโลนีที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยสีท โดยใช้เข็มเย็บเชื้อปลายแหลมเขี่ยโคโลนีมาขีดบนอาหาร Yeast extract – Malt extract agar บ่มให้เจริญและตรวจสอบความบริสุทธิ์ แล้วเก็บในหลอด (slant) เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.1.4 การเก็บรักษาแอคติโนมัยสีทที่แยกได้

ทำการเก็บรักษาโดยเลี้ยงแอคติโนมัยสีทบนอาหารวุ้นเอียงในหลอด บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือเก็บรักษาด้วยกระบวนการแช่แข็ง (deep freeze) ใน 10% glycerol และวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization)

3.1.5 การคัดเลือกแบคทีเรียแอคติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพขั้นต้น

ทำการเลี้ยงเชื้อที่แยกได้บนอาหาร Yeast extract – Malt extract agar โดยการขีดเป็นเส้นตรงเส้นเดียวยาวตามแนวนอนจากขอบหนึ่งถึงอีกขอบหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้แอคติโนมัยสีทผลิตสารและสารสามารถแพร่เข้าไปในเนื้อวุ้น จากนั้นตรวจสอบการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยจุลินทรีย์ทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus*

subtilis ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (= *Kocuria rhizophila* ATCC 9341), *Escherichia coli* ATCC 25922 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Candida albicans* ATCC 10231 โดยลากจุลินทรีย์ทดสอบให้ซิดและเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับแนวของเชื้อแอคติโนมัยสีทมากที่สุด บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วันตรวจสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวัดระยะทางจากแนวของแบคทีเรียแอคติโนมัยสีท จนถึงแนวที่จุลินทรีย์ทดสอบสามารถเจริญได้ แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่แสดงฤทธิ์ดีเพื่อทำการศึกษาต่อไป

จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ใดสามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้ จากนั้นจะนำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลชีพไปศึกษาในขั้นต่อไป

3.2 การหมักเพื่อผลิตสารหัตถิยภูมิ

คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพดีมาทำการเลี้ยงในอาหาร ISP2 (Yeast extract – Malt extract broth) บ่มเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน จากนั้นเลี้ยงต่อในอาหาร Production medium (Yeast extract – Malt extract broth ที่เติม 0.1% CaCO₃) ใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน

3.3 การสกัดสารสกัดหยาบจากน้ำหมัก

นำน้ำหมักแอคติโนมัยสีทของสายพันธุ์ที่คัดเลือกมา กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เพื่อแยกเอาส่วนน้ำใสและเซลล์ออกจากกัน จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาทำการสกัดด้วย ethyl acetate 3 ครั้งแล้วนำไประเหยให้แห้งภายใต้การลดความดัน จะได้สารสกัดหยาบในส่วน ethyl acetate (crude) และนำสารสกัดหยาบที่ได้ไปหาองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นโดยวิธี Thin layer chromatography และทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้น

3.4 ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น

ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นของสารสกัดหยาบของเชื้อแอคติโนมัยสีทที่คัดเลือกโดยนำสารสกัดหยาบที่คัดเลือกมาผ่าน seppak ODS column โดยใช้ gradient 0-100% methanol เป็น mobile phase จากนั้นนำสารแต่ละ fraction มาวิเคราะห์ด้วย High performance liquid chromatography system (0-95% gradient acetonitrile + 0.05% phosphoric acid; flow rate 0.2 ml/min) และ Liquid chromatography/Mass spectrometry และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ในฐานข้อมูลของ Dictionary of natural product software

3.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดเหยาบ

นำสารสกัดเหยาบที่ได้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้นด้วยวิธี Agar disc diffusion (Lorian, 1980) โดยเตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Mueller-Hinton Agar (MHA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) สำหรับเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ตามลำดับ นำเชื้อทดสอบผสมกับน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบเชื้อแขวนลอยที่เตรียมไว้ทาลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำแผ่นดิสก์ที่หยดสารละลายของสารสกัดที่ต้องการทดสอบ ปริมาณ 20 $\mu\text{l}/\text{disc}$ ทิ้งให้แห้งแล้ววางลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบและทำชุดควบคุมเชิงลบและชุดควบคุมเชิงบวกควบคู่กับสารสกัดเหยาบ โดยชุดควบคุมเชิงลบจะใช้ตัวทำละลายที่ใช้ละลายสารสกัดที่นำมาทดสอบ และชุดควบคุมเชิงบวกโดยใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมกับเชื้อจุลินทรีย์นั้นๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นแบคทีเรีย และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมงสำหรับเชื้อทดสอบที่เป็นยีสต์ ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญ (inhibition zone) ซึ่งแสดงความสามารถของสารสกัดในการต้านการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด จากนั้นเลือกสารสกัดเหยาบที่มีฤทธิ์ดีที่สุดมาแยกองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีต่อไป

3.6. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแอกติโนมัยสีท

ทำโดยอาศัยผลการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทดังนี้

3.6.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี (Miyadoh, 1997; Locci, 1989) ตรวจสอบลักษณะทางการเจริญโดยเลี้ยงแอกติโนมัยสีทบนอาหารชนิดต่างๆที่กำหนดอยู่ใน International *Streptomyces* Project (ISP) โดยวิธี Crosshatch streak (Shiring and Gottlieb, 1966) ตรวจสอบผลโดยดูการเจริญ เนื้อและสีของโคโลนีด้านบน สีของโคโลนีด้านล่างและรงควัตถุที่ละลายน้ำได้เทียบกับกระดาษสีมาตรฐาน (The Jacal Color Card L2200, Japan Color Research Institute หรือ The NBS/IBCC Color System) ตรวจสอบลักษณะของเส้นใยและการสร้างสปอร์ด้วยเทคนิค Simple inclined coverslip (Williams and Cross, 1971) ตรวจสอบลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบลักษณะสปอร์ของเชื้อที่คัดเลือกด้วย Scanning Electron Microscope (SEM) โดยวิธีการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่วนลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีทำโดยการตรวจสอบการสลายแป้ง การสลายไคติน การสลายเซลลูโลส การสลายโปรตีนในนม (Williams and Cross, 1971) การสลายเจลาติน การรีดิวซ์ไนเตรท (Arai, 1975) การทนอุณหภูมิ การทนเกลือ การทนความเป็นกรด-ด่างและการใช้แหล่งคาร์บอน (Shiring and Gottlieb, 1966)

3.6.2 การวิเคราะห์ผนังเซลล์ (Komagata and Suzuki, 1987)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือก 1 สายพันธุ์ในอาหารเหลว Yeast extract - Malt extract broth บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเชื้อโดยการ centrifuge และทำให้เซลล์แห้งภายใต้ความเย็น (Freezed drying) นำเซลล์แห้งไปตรวจสอบ diaminopimelic acid ของเชื้อโดยสลาย

เซลล์แห้งด้วย 6N HCl ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไป spot บนแผ่น TLC (Merck No. 5577) develop ด้วย methanol - water - 6N HCl - pyridine (80:26:4:10) ใช้ 0.5% ninhydrin solution ใน n-butanol ฟัน แล้วให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส 2-3 นาที เพื่อดู spot ที่เกิดขึ้นเทียบกับ standard diaminopimelic acid

3.6.3 การวิเคราะห์ fatty acid ของเซลล์

เตรียมตัวอย่างเซลล์แห้ง (freeze dried cells) ปริมาณ 20-40 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองแบบฝาเกลียว เพื่อเตรียม fatty acid ให้ในอยู่รูป fatty acid methyl ester โดยวิธีของ Sasser (1990) จากนั้นนำ fatty acid methyl ester ที่ได้มาวิเคราะห์โดย gas chromatography โดยใช้ Sherlock Microbial Identification System (MIS) (MIDI, Microbial ID, Newark, DE 19711 U.S.A.)

3.6.4 การวิเคราะห์ polar lipids ของเซลล์

เตรียมตัวอย่างเซลล์แห้ง (freeze dry cells) 150 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองแบบฝาเกลียว จากนั้นสกัด polar lipids โดยวิธีของ Minnikin และคณะ (1984) จากนั้นนำตัวอย่าง polar lipids ที่ได้มาวิเคราะห์โดย Thin layer chromatography แบบ 2 มิติ โดยใช้ Chloroform-methanol-H₂O อัตราส่วน 65:25:4 เป็น mobile phase ในมิติแรก จากนั้น ในมิติที่ 2 ใช้ Chloroform-กรดอะซีติก-เมทานอล-และน้ำ อัตราส่วน (40:7.5:6:2) เป็น mobile phase จากนั้น นำแผ่น TLC ที่ได้มาตรวจสอบโดยใช้ spraying reagent ชนิดต่างๆคือ Dittmer & Lester (total phospholipids), ninhydrin, anisaldehyde, Dragendorff's reagent และ Phosphomolybdic acid ใน 5 % เอทานอล(Total lipids)

3.6.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Bouček-Mechiche et al., 2000; Stackebrandt and Goebel, 1994)

3.6.5.1 การแยก DNA และทำให้บริสุทธิ์ (Tamaoka, 1994)

เลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ที่คัดเลือก 1 สายพันธุ์ใน Yeast extract-Malt extract broth เป็นเวลา 3 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเชื้อและล้างด้วย saline-EDTA แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย lysozyme และ Tris-SDS solution จากนั้นสกัดด้วย phenol และ chloroform ตกตะกอน DNA ด้วย ethanol ทำให้บริสุทธิ์โดยกำจัด RNA ด้วย RNase A แล้วเก็บ DNA ที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.6.5.2 การเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำ DNA ที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณ DNA ในช่วง 16S rRNA gene โดยใช้ Universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA Thermal cycler (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems)

3.6.5.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16S rRNA gene

นำตัวอย่าง DNA ที่เพิ่มปริมาณได้ไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วย ABI PRISM BigDye Terminator cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem)

3.6.5.4 การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic Analysis)

ทำการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับ selected sequences ที่ได้มาจากฐานข้อมูล Genbank / EMBL / DDBJ โดยใช้ alignment software (ในกรณีนี้ใช้ CLUSTAL W program package) จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA (Kumar et. al., 2001; Saito and Nei, 1987) และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้

3.6.6 การศึกษา DNA base composition (Tamaoka, 1994) และ DNA-DNA hybridization (Ezaki et al., 1989) นำ DNA บริสุทธิ์ ของแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้ ไปวิเคราะห์หา G + C content ของ DNA โดยใช้ reversed-phase HPLC และนำ DNA บริสุทธิ์ของแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกได้ และ type strain ไปทำการตรึง โดยให้มี DNA ปริมาณที่เท่ากัน หยดลงในหลุมของ microdilution plates ทำการ hybridize ด้วย DNA probe ซึ่งเตรียมมาจาก DNA ของ type strain โดยติดฉลากด้วย photobiotin แล้วตรวจหา photobiotin โดยการทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ streptavidin ที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ β -D-galactosidase แล้วจึงทดสอบหาปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติมสารตั้งต้น 4-methylumbelliferyl- β -D-galactosidase ตรวจสอบด้วยเครื่อง fluorometric microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ 100 % homology ของ positive control (DNA จาก type strain ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการแยกแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินป่าพรุ

จากการแยกตัวอย่างดินตัวอย่างดินจากป่าพรุหนองจำรุงจังหวัดระยองจำนวน 16 ตัวอย่าง ได้แบคทีเรียแอกติโนมัยสีทจำนวน 77 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

4.2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแอกติโนมัยสีท

4.2.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของแอกติโนมัยสีทที่แยกได้จำนวน 77 ไอโซเลตพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มแอกติโนมัยสีทออกได้เป็นกลุ่มย่อยตามลักษณะสปอร์คือ

กลุ่มที่ 1 (35 ไอโซเลต) มีการสร้างสปอร์ที่มีลักษณะต่อกันสายเกลียวขดตัวคล้ายสปริงบน aerial mycelium มีการสร้าง substrate mycelium ที่ไม่แตกหักและมีลักษณะแผ่กระจายออกเป็นวงกว้าง โดยคาดการณ์ว่าแอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มของ สกุล *Streptomyces*

กลุ่มที่ 2 (3 ไอโซเลต) แอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้มีโคโลนีสีส้มจนถึงน้ำตาลดำ ไม่มีการสร้าง aerial mycelium แลพบการสร้างสปอร์เดี่ยวบน substrate mycelium ลักษณะดังกล่าวคาดการณ์ว่าแอกติโนมัยสีทในกลุ่มนี้น่าจะเป็นกลุ่มของ สกุล *Micromonospora*

กลุ่มที่ 3 (9 ไอโซเลต) แอกติโนมัยสีทกลุ่มนี้พบการสร้างสปอร์เป็นคู่บน aerial mycelium ไม่พบการแตกหักของ substrate mycelium และไม่พบสปอร์บน substrate mycelium โคโลนีส่วนใหญ่มีสีขาวอมชมพู ลักษณะดังกล่าวคาดการณ์ว่าแอกติโนมัยสีทกลุ่มนี้น่าจะเป็นกลุ่มของ สกุล *Microbispora*

กลุ่มที่ 4 (6 ไอโซเลต) มีการสร้างสปอร์ที่มีลักษณะเป็นช่อบน aerial mycelium ไม่พบการแตกหักของ substrate mycelium โคโลนีส่วนใหญ่ เป็นสีน้ำตาล และพบบางไอโซเลตมีสีขาวและสีน้ำตาล แอกติโนมัยสีทกลุ่มนี้คาดการณ์ว่าเป็นกลุ่มของ สกุล *Microtetraspora*

กลุ่มที่ 5 (4 ไอโซเลต) กลุ่มนี้พบการสร้าง aerial mycelium ไม่ชัดเจน ลักษณะพิเศษคือ substrate mycelium มีการแตกหักเป็นท่อน โคโลนีส่วนใหญ่มีสีขาวจนถึงขาวอมชมพู บางครั้งมีสีขาวอมส้ม ลักษณะดังกล่าวคาดการณ์ว่าน่าจะเป็นกลุ่มของ สกุล *Nocardia*

กลุ่มที่ 6 (4 ไอโซเลต) กลุ่มนี้พบมีการสร้างสปอร์เป็นสายสั้นๆบน aerial mycelium โดยมีการขดตัวคล้ายวงกลม และคล้ายตะขอ substrate mycelium ไม่มีการแตกหัก คาดการณ์ว่าน่าจะเป็นเชื้อในสกุล *Actinomadura*, *Nonomuraea* หรือ *Actinoallomurus*

กลุ่มที่ 7 (3 ไอโซเลต) กลุ่มนี้มีการสร้างโคโลนีสีส้มจนไปถึงสีน้ำตาล ไม่มีการสร้าง aerial mycelium พบเฉพาะ substrate mycelium และมีการสร้าง sporangium รูปร่างคล้ายกระบองขึ้นมาบริเวณผิวของ agar คาดการณ์ว่าน่าจะเป็นกลุ่มของ สกุล *Dactylosporangium*

กลุ่มที่ 8 (13 ไอโซเลต) กลุ่มนี้ไม่พบการสร้างสปอร์หรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เป็น key character ที่ในการวิเคราะห์ในระดับสกุล จึงจัดให้แอกติโนมัยสีทเหล่านี้อยู่ในกลุ่ม Unidentified

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมีของแอกติโนมัยสีทบางไอโซเลตได้แสดงดังตารางที่ 2, 3, และ 4 และภาพที่ 1-6

4.2.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือกจำนวน 28 ไอโซเลต พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Streptomyces* 12 ไอโซเลต ได้แก่ *Streptomyces demainii*, *S. lannensis*, *S. yunnanensis* (2 ไอโซเลต), *S. malaysiensis*, *S. thermoviolaceus subsp. apigens*, *S. drozdowiczii*, *S. ossamyceticus*, *S. echinatus*, *S. parvulus*, *S. laurentii*, และ *S. graminearus* สกุล *Microbispora* 6 ไอโซเลต ได้แก่ *Microbispora corallina* (2 ไอโซเลต), *Microbispora amethytogenes* (3 ไอโซเลต) และ *Microbispora hainanensis* สกุล *Microtetraspora* 4 ไอโซเลต ได้แก่ *Microtetraspora glauca* (3 ไอโซเลต) และ *Microtetraspora malaysiensis* สกุล *Actinomadura* 1 ไอโซเลต ได้แก่ *Actinomadura atramentaria* สกุล *Dactylosporangium* 3 ไอโซเลต ได้แก่ *Dactylosporangium darangshiense* และ *Dactylosporangium salmonium* (2 ไอโซเลต) สกุล *Nocardia* 1 ไอโซเลต คือ *Nocardia nova* และ สกุล *Actinoallomurus* 1 ไอโซเลต คือ *Actinoallomurus luridus* (ตารางที่ 5)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง 16S rRNA gene และ DNA-DNA relatedness ของแบคทีเรียโดย Stackebrandt และ Ebers ในปี 2006 พบว่าหาก 16S rRNA gene similarity ต่ำกว่า 98.5% จะมีค่า DNA-DNA relatedness ต่ำกว่า 70% ซึ่งเป็นค่าที่ใช้แยกสิ่งมีชีวิตระหว่าง 2 species อย่างไรก็ตามหาก 16S rRNA gene similarity มากกว่า 98.5% ก็มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่แต่ต้องทำการทดลอง DNA-DNA hybridization เทียบกับสายพันธุ์ใกล้เคียง จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าในจำนวน 29 ไอโซเลตนี้มีมีแบคทีเรียที่มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ จำนวน 8 ไอโซเลต คือ RCU-064, RCU-197, RCU-201, RY33-4, RY33-9, RY35-68, RY35-23 และ RY9-5 ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 7-9

ผลการศึกษาทางสัณฐานวิทยา การเจริญ ชีวเคมี สรีรวิทยา รวมถึงการวิเคราะห์ 16S rRNA gene แสดงให้เห็นว่า ป่าพรุหนองจำรุงมีความหลากหลายทางชีวภาพของแอกติโนมัยสีททั้งด้านชนิดและปริมาณ โดยพบว่าแอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่ที่แยกได้จากป่าพรุหนองจำรุงเป็นสกุล *Streptomyces* ซึ่งสัมพันธ์กับการรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการแยกแอกติโนมัยสีทจากดินของประเทศไทยโดย ภรณ์ และคณะ ในปี 2555 และ 2557 (Sripreechasak et al., 2013; Sripreechasak et al., 2014) โดยพบว่า มี

Streptomyces tendae, *S. malachitospinus*, *S. marokkonensis*, *S. parvulus*, *S. fragilis*, *S. diastaticus*, *S. drozdowiczii*, *S. olivochromogenes*, *S. aureus*, *S. iranensis*, *S. rapamycinicus*, *S. yatensis*, *S. samsunensis*, *S. exfoliates*, *S. vinaceusdrappus*, *S. tendae*, *S. aureus*, *S. atriruber*, *S. olivochromogenes*, *S. malaysiensis*, *S. purpeofuscus*, *S. sparsogenes*, *S. aldersoniae*, *S. rapamycinicus*, *S. youssoufiensis* และ *S. spiralis*

ถึงแม้ว่าแอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่ที่แยกได้จะเป็นสกุล *Streptomyces* เหมือนกับที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้แล้ว แต่ตัวอย่างไอโซเลตที่แยกได้จากป่าพรุมีความแตกต่างของสายพันธุ์ (species) จากที่เคยแยกได้จากที่อื่นทั้งนี้อาจเกิดจากตัวอย่างของดินป่าพรุเองและวิธีการที่ใช้แยกที่ทำให้ได้ไอโซเลตที่มีลักษณะแตกต่างออกไป นอกจากนี้ตัวอย่างที่แยกได้จากป่าพรุยังพบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะสายพันธุ์ที่เป็นสปีชีส์ใหม่ จำนวนหลายสปีชีส์ (ตารางที่ 6) อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของบางสายพันธุ์ยังไม่สมบูรณ์ จึงต้องศึกษาเพิ่มเติมและพบว่าบางสายพันธุ์ไม่สร้างสปอร์ จึงยังไม่สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ (unidentified) ของสายพันธุ์เหล่านั้นได้และต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

4.3 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ

4.3.1 แบคทีเรียแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพขั้นต้น

จากการคัดกรองแอกติโนมัยสีทที่มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียขั้นต้นพบว่า มีแอกติโนมัยสีทที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพทดสอบขั้นต้นจำนวน 41 สายพันธุ์ โดยเป็นแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทในสกุล *Streptomyces* จำนวน 25 สายพันธุ์ *Micromonospora* จำนวน 1 สายพันธุ์ *Microtetraspora* จำนวน 1 สายพันธุ์ *Microbispora* จำนวน 6 สายพันธุ์ *Dactylosporangium* จำนวน 2 สายพันธุ์ *Actinoallomurus* 1 สายพันธุ์ และ Unidentified จำนวน 5 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 3

จากผลการคัดกรองพบว่า แอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่ที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบเป็นเชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อทดสอบที่ถูกยับยั้งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งสอดคล้องกับการสำรวจของ Berdey และคณะ ในปี 2005 ที่รายงานว่าแอกติโนมัยสีทส่วนใหญ่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์เป็นสายพันธุ์ในสกุล *Streptomyces* และส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก

4.3.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจากสายพันธุ์ที่คัดเลือก

เมื่อคัดเลือกแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียดีที่สุด 8 อันดับจากการทดสอบฤทธิ์ขั้นต้นจำนวน 8 สายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลวและนำน้ำหมักเชื้อมาพาพิซัน (partition) ด้วยเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) และนำสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตตมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย

พบว่า มี 4 สายพันธุ์ที่มีฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (= *Kocuria rhizophila* ATCC 9341) ดังแสดงในตารางที่ 7

จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบ ผู้วิจัยได้คัดเลือกแบคทีเรียแอคติโนมัยซีทไอโซเลต RCU-197 มาศึกษาต่อ โดยใช้เกณฑ์ในการเลือกแบคทีเรียไอโซเลตนี้คือ 1. เป็นไอโซเลตที่มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นแบคทีเรียแอคติโนมัยซีทสปีชีส์ใหม่และ 2. เป็นไอโซเลตที่สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุดทั้งจากการทดสอบขั้นต้นและสารสกัดหยาบ

4.3.3 ผลการแยกและวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ต้านจุลชีพที่สร้างจากแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือก

เมื่อนำน้ำหมักของแบคทีเรียไอโซเลต RCU-197 ในอาหาร ISP2 มาแยกโดย seppak ODS column โดยใช้ gradient methanol เป็น mobile phase ดังแสดงในภาพที่ 10 a พบว่า fraction ที่ 80% เมทานอล และ 100% เมทานอล แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (ภาพที่ 11) คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (= *Kocuria rhizophila* ATCC 9341) เมื่อนำ Fraction ทั้งสองไปวิเคราะห์โดย LC/UV พบว่า ทั้งสอง fraction มีลักษณะร่วมกันคือ peak ที่เวลา 17.40 นาที และมีลักษณะของ UV spectrum คล้ายคลึงกับ สารในกลุ่ม actinomycin โดยมี λ_{max} ที่ 202, 236 และ 443 nm ดังแสดงในภาพที่ 10 b และ c ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างสารปฏิชีวนะใน fraction ที่ 80% เมทานอล และ 100% เมทานอล โดย LC/MS/MS พบว่าตัวอย่างสารทั้งสอง fraction ข้างต้น มี $[M+H]^+$ เท่ากับ 1255.6187 (ภาพที่ 12) และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูล UV spectrum และ High molecular mass ในฐานข้อมูล Dictionary of natural product พบว่าตรงกับ Actinomycin D จึงอาจสรุปได้ว่า สารปฏิชีวนะที่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต RCU-197 สร้างและมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกคือ สารในกลุ่ม Actinomycin D

ตารางที่ 1 Sample number, pH and actinomycete isolates

Sample No.	Sample type	Sample pH	Isolate no.	No. of isolate
RY2	Sediment	4.86	RY2-4, RY2-6, RY2-9	3
RY9	Sediment	5.36	RY9-2, RY9-4, RY9-5	3
RY17	Soil	3.94	RY17-7	1
RY33	Soil	3.88	RY33-3, RY33-4, RY33-9, RY33-10, RY33-12, RY33-13, RY33-23, RY33-27, RY33-32	9
RY35	Soil	6.57	RY35-1, RY35-3, RY35-4, RY35-5, RY35-6, RY35-8, RY35-9, RY35-10, RY35-11, RY35-12, RY35-14, RY35-15, RY35-17, RY35-18, RY35-19, RY35-21, RY35-23, RY35-29, RY35-30, RY35-32, RY35-34, RY35-45, RY35-68, RY35-69, RY35-70, RY35-77, RY35-78, RY35-79, RY35-82	29
RY42	Soil	4.75	RY42-1, RY42-6, RY42-13, RY42-16	4
RY43	Soil	4.13	RY43-3, RY43-4, RY43-5, RY43-9, RY43-10, RY43-11, RY43-13, RY43-14, RY43-15, RY43-20, RY43-21, RY43-22, RY43-27	13
RY45	Soil	2.82	RY45-20	1
1/5	Soil	4.5-5.5	RCU-183, RCU-064	2
2/6	Soil		RCU-224	1
3/2	Soil		RCU-038, RCU-103, RCU-111	3
7/2	Soil		RCU-049, RCU-050	2
4/8	Soil		RCU-213, RCU-217	2
8/1	Soil		RCU-181	1
RB1	Soil		RCU-043	1
RB2	Soil		RCU-197, RCU-178	2
			Total	77

ตารางที่ 2 Cultural characteristic of actinomycete isolates on ISP2 agar

Isolate No.	Growth	Color of Upper phase	Color of substrate mycelium	Soluble pigment	Sporulation types	Genus
RCU-038	Good	Yellowish white	Pale yellowish green	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RCU-043	Good	Grayish greenish yellow	Dark yellowish green	Moderate greenish yellow	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RCU-049	Good	Moderate greenish yellow	Pale greenish yellow	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RCU-050	Good	Moderate greenish yellow	Pale greenish yellow	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RCU-064	Good	Light yellowish brown	Light olive brown	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RCU-103	Good	Grayish greenish yellow	Light olive	Brilliant yellow	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RCU-111	Good	Grayish greenish yellow	Light olive	Grayish greenish yellow	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RCU-178	Good	White	Light yellow	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RCU-197	Good	Deep yellow	Dark orange yellow	Vivid yellow	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY2-4	Good	White to Medium gray	Strong yellowish brown	Brilliant yellow	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-1	Good	White	Strong yellowish brown to Light orange yellow	Dark orange yellow	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-10	Good	Pale blue	Deep yellow	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-11	Good	Light bluish gray	Deep reddish purple to Strong yellow	Light brown	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-12	Good	Pinkish white	Strong yellow to Deep yellow	Light greenish yellow	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-14	Good	Bluish gray	Dark yellowish brown	Light yellowish brown	Polysporous	<i>Streptomyces</i>

ตารางที่ 2 Cultural characteristic of actinomycete isolates on ISP2 agar (Cont.)

Isolate No.	Growth	Color of Upper phase	Color of substrate mycelium	Soluble pigment	Sporulation types	Genus
RY35-15	Good	Pale yellowish pink	Light yellow	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-17	Good	Moderate yellowish pink	Deep yellow	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-29	Good	Light yellowish pink	Strong yellowish brown	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-32	Good	Greenish white	Deep yellowish brown	Deep yellow	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-34	Good	White	Pale yellow to Dark yellow	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-45	Good	Grayish yellow	Strong yellowish brown	Moderate yellow	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-5	Good	Pale Yellow	Pale yellow	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-6	Good	Medium gray	Moderate yellowish brown	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-69	Good	Pale orange yellow	Light yellow	-	ND	<i>Streptomyces</i>
RY35-70	Good	Black	Brownish black	-	ND	<i>Streptomyces</i>
RY35-77	Good	Dark yellow	Deep yellow	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-8	Good	Strong yellow	Strong yellow	-	Oligosporous	<i>Streptomyces</i>
RY35-82	Good	Grayish yellowish brown	Deep yellowish brown	Dark yellow	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY43-11	Good	Light grayish olive	Dark olive	Light olive	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY43-14	Good	Yellowish gray	Dark olive	Moderate olive	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY43-21	Good	Yellowish gray	Black	Brownish black	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY43-22	Good	White to Pinkish gray	Blackish blue	Dark grayish olive green	Polysporous	<i>Streptomyces</i>

ตารางที่ 2 Cultural characteristic of actinomycete isolates on ISP2 agar (Cont.)

Isolate No.	Growth	Color of Upper phase	Color of substrate mycelium	Soluble pigment	Sporulation types	Genus
RY43-27	Good	White	Dark orange yellow	Deep orange yellow	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY43-3	Good	White to Light bluish gray	Light yellow to Moderate yellow	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RY43-5	Good	White to Purplish gray	Light yellowish brown	-	Polysporous	<i>Streptomyces</i>
RCU-217	Good	Deep yellow	Light brownish gray	-	Unidentify	Unidentified
RY33-12	Good	Deep yellowish brown	Dark yellowish brown	-	ND	Unidentified
RY33-13	Good	Strong brown	Dark yellowish brown	-	Oligosporous	Unidentified
RY33-32	Good	Deep yellowish brown	Dark yellowish brown	-	Oligosporous	Unidentified
RY35-18	Good	White	Strong yellowish brown	Brilliant strong yellow	ND	Unidentified
RY35-21	Good	White to Light bluish gray	Dark yellow to Moderate yellow	-	ND	Unidentified
RY35-30	Good	Moderate yellowish brown	Moderate yellowish brown	Grayish yellow	ND	Unidentified
RY35-4	Good	Greenish gray	Moderate yellowish brown	-	ND	Unidentified
RY35-78	Good	Pale yellow	Pale yellow	-	ND	Unidentified
RY43-10	Good	Moderate yellowish brown	Moderate yellowish brown	Light yellowish brown	ND	Unidentified
RY43-15	Moderate	White	Dark yellow	-	ND	Unidentified
RY43-9	Good	Purplish gray	Light olive brown	-	ND	Unidentified
RY9-2	Good	Vivid orange yellow	Vivid orange yellow	-	ND	Unidentified

ตารางที่ 2 Cultural characteristic of rare actinomycete isolates on ISP2 agar (Cont.)

Isolate No.	Growth	Color of Upper phase	Color of substrate mycelium	Soluble pigment	Sporulation types	Genus
RY35-9	Good	Vivid orange	Vivid orange	-	Monosporous	<i>Micromonospora</i>
RY43-13	Moderate	Dark yellowish brown	Deep yellowish brown	Pale greenish yellow	Monosporous	<i>Micromonospora</i>
RY9-4	Moderate	Pale yellow	Pale yellow	-	Monosporous	<i>Micromonospora</i>
RCU-224	Good	Brownish orange	Brownish orange	-	Bisporous	<i>Microbispora</i>
RY17-7	Good	Pale orange yellow	Moderate yellow	-	Bisporous	<i>Microbispora</i>
RY33-27	Good	Strong yellow	Moderate yellow	-	Bisporous	<i>Microbispora</i>
RY33-3	Good	Moderate yellow	Moderate yellow	-	Bisporous	<i>Microbispora</i>
RY33-4	Good	Light yellow	Light yellow	-	Bisporous	<i>Microbispora</i>
RY33-9	Good	Pale orange yellow	Moderate yellow	-	Bisporous	<i>Microbispora</i>
RY42-1	Good	Moderate yellow	Moderate yellow	-	Bisporous	<i>Microbispora</i>
RY42-13	Good	Strong orange yellow	Strong orange yellow	-	Bisporous	<i>Microbispora</i>
RY45-20	Good	Moderate orange	Moderate orange	-	Bisporous	<i>Microbispora</i>
RCU-181	Good	Dark greenish yellow	Pale greenish yellow to Dark greenish yellow	-	Oligosporous	<i>Microtetraspora</i>
RCU-183	Good	Brownish orange	Brownish orange	-	Oligosporous	<i>Microtetraspora</i>

ตารางที่ 2 Cultural characteristic of actinomycete isolates on ISP2 agar

Isolate No.	Growth	Color of Upper phase	Color of substrate mycelium	Soluble pigment	Sporulation types	Genus
RCU-213	Good	Strong yellowish brown	Deep yellowish brown	-	Oligosporous	<i>Microtetraspora</i>
RY2-6	Good	Strong yellowish brown	Dark yellowish brown	-	Oligosporous	<i>Microtetraspora</i>
RY2-9	Good	Deep yellowish brown	Strong yellowish brown	-	Oligosporous	<i>Microtetraspora</i>
RY33-23	Good	Strong brown	Dark brown	-	Oligosporous	<i>Microtetraspora</i>
RY35-19	Good	Vivid orange yellow	Light orange yellow	-	Oligosporous	<i>Nocardia</i>
RY35-3	Good	Light orange yellow	Pale orange yellow	-	Oligosporous	<i>Nocardia</i>
RY43-20	Good	Strong orange yellow	Strong orange yellow	-	Oligosporous	<i>Nocardia</i>
RY43-4	Good	Light orange	Strong orange yellow	-	Oligosporous	<i>Nocardia</i>
RY35-68	Good	Strong brown	Strong yellowish brown	-	Oligosporous	<i>Actinomadura</i>
RY33-10	Good	Deep yellowish brown	Dark yellowish brown	-	Oligosporous	<i>Actinomadura</i>
RY35-79	Good	Strong orange yellow	Strong orange yellow	-	Polysporous	<i>Nonomuraea</i>
RY35-23	Good	Pale yellow	Pale yellow	-	Oligosporous	<i>Dactylosporangium</i>
RY42-16	Good	Moderate yellow	Moderate yellow	-	Oligosporous	<i>Dactylosporangium</i>
RY42-6	Good	Light orange yellow	Moderate yellow	-	Oligosporous	<i>Dactylosporangium</i>
RY9-5	Moderate	Pale yellow	Pale brown	-	Oligosporous	<i>Actinoallomurus</i>

-, no reaction; ND, not detected.

ตารางที่ 3 Phenotypic characteristics of actinomycete isolates and antimicrobial activity

Isolate No.	Growth at		Tolerance of NaCl (%)	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Gelatin liquefaction	Milk		Inhibition length (mm)					
	4 °C	45 °C					Peptonization	Coagulation	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
RCU-038	-	+	8	+	+	+	+	-	40	50	40	34	25	40
RCU-043	-	-	5	-	+	+	+	-	40	40	40	20	22	40
RCU-049		-	8	-	+	-	+	-	40	40	40	40	40	40
RCU-050	-	-	8	-	-	-	+	-	>25	>25	>25	>25	>25	>25
RCU-064	-	-	5	-	+	±	+	-	43	43	33	40	-	40
RCU-103	-	+	8	+	+	+	+	-	40	30	40	12	-	7
RCU-111	-	-	8	-	-	+	+	-	40	40	40	40	-	16
RCU-178	-	-	6	-	+	±	-	-	25	17	22	11	7	13
RCU-197	-	+	7	ND	+	±	+	-	40	40	40	-	33	32
RY2-4	-	-	ND	+	+	+	+	+	22	35	45	10	-	4
RY35-1	-	-	6	-	+	±	ND	ND	-	-	-	-	-	-
RY35-10	-	-	ND	-	+	+	+	+	16	20	20	30	20	-

ตารางที่ 3 Phenotypic characteristics of actinomycete isolates and antimicrobial activity (continued))

Isolate No.	Growth at		Maximum NaCl tolerance (%)	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Gelatin liquefaction	Milk		Inhibition length (mm)					
	4 °C	45 °C					Peptonization	Coagulation	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
RY35-11	-	-	6	+	+	±	+	-	8	-	8	-	-	-
RY35-12	-	-	2	+	+	±	ND	ND	14	9	11	-	-	11
RY35-14	-	-	6	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
RY35-15	-	-	3	+	+	±	+	+	17	12	12	-	-	9
RY35-17	-	-	4	+	+	±	+	+	12	10	9	-	-	-
RY35-29	-	-	3	+	+	±	+	-	10	14	15	-	-	-
RY35-32	-	+	7	+	+	ND	+	+	15	10	12	8	-	-
RY35-34	-	-	6	-	+	+	+	+	40	>40	35	-	-	>40
RY35-45	-	-	7	-	+	+	-	+	8	18	-	-	-	4
RY35-5	-	-	3	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
RY35-6	-	-	7	-	+	-	+	+	24	-	22	-	-	-

ตารางที่ 3 Phenotypic characteristics of actinomycete isolates and antimicrobial activity (continued)

Isolate No.	Growth at		Maximum NaCl tolerance (%)	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Gelatin liquefaction	Milk		Inhibition length (mm)					
	4 °C	45 °C					Peptonization	Coagulation	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
RY35-69	-	-	8	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RY35-70	-	+	7	-	+	ND	+	+	-	-	-	-	-	-
RY35-77	-	-	3	+	+	+	+	+	18	15	13	17	13	-
RY35-78	-	-	0	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RY35-79	-	-	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RY35-8	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RY35-82	-	-	3	+	+	+	+	+	22	-	-	-	-	-
RY43-11	-	-	6	-	-	+	+	+	23	-	10	16	-	11
RY42-14	-	-	7	ND	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RY43-21	-	-	ND	-	+	+	+	+	25	8	12	-	-	5
RY43-22	-	-	ND	-	+	+	+	-	-	-	10	-	-	-
RY43-27	-	-	1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RY43-3	-	-	ND	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3 Phenotypic characteristics of actinomycete isolates and antimicrobial activity (continued)

Isolate No.	Growth at		Maximum NaCl tolerance (%)	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Gelatin liquefaction	Milk		Inhibition length (mm)					
	4 °C	45 °C					Peptonization	Coagulation	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
RY43-5	-	+	ND	ND	ND	+	+	+	32	10	15	-	-	-
RCU-217	-	-	3	-	-	-	+	±	12	-	8	-	-	-
RY33-12	-	+	2	+	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
RY33-13	-	+	2	+	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
RY33-32	-	-	1	+	-	ND	-	±	-	-	-	-	-	-
RY35-18	-	-	6	-	+	+	+	-	23	18	19	-	-	-
RY35-21	-	-	ND	-	+	+	ND	ND	13	6	-	-	-	-
RY35-30	-	-	6	-	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
RY35-4	-	-	6	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
RY35-78	-	-	0	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RY43-10	ND	-	0	-	+	-	+	-	40	-	10	-	-	-

ตารางที่ 3 Phenotypic characteristics of actinomycete isolates and antimicrobial activity (continued)

Isolate No.	Growth at		Maximum Nacl tolerance (%)	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Gelatin liquefaction	Milk		Inhibition length (mm)						
	4 °C	45 °C					Peptonization	Coagulation	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	
RY43-15	-	-	7	ND	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RY43-9	ND	-	1	±	+	ND	ND	ND	-	-	8	-	-	-	-
RY9-2	-	+	1	-	+	ND	+	+	-	-	-	-	-	-	-
RY35-23	-	-	3	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
RY35-9	-	-	1	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RY43-13	-	-	0	-	+	+	+	+	10	-	15	-	-	-	-
RY9-4	-	-	0	-	ND	ND	+	+	-	-	-	-	-	-	-
RCU-224	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-
RY17-7	-	+	2	-	+	-	±	±	-	-	21	-	-	-	-
RY33-27	-	-	1	-	ND	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-
RY33-3	-	+	1	-	+	ND	-	-	-	-	9	-	-	-	-

ตารางที่ 3 Phenotypic characteristics of actinomycete isolates and antimicrobial activity (cont)

Isolate No.	Growth at		Maximum NaCl tolerance (%)	Nitrate reduction	Starch hydrolysis	Gelatin liquefaction	Milk		Inhibition length (mm)						
	4 °C	45 °C					Peptonization	Coagulation	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	
RY35-3	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RY43-20	-	-	5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RY43-4	-	-	5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RY35-68	-	+	3	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
RY33-10	-	ND	3	-	-	ND	ND		-	-	-	-	-	-	-
RY35-79	-	-	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
RY42-16	-	+	1	-	ND	+	-	-	13	5	5	-	-	-	-
RY42-6	-	-	1	-	+	-	+	+	2	5	-	-	-	-	-
RY9-5	-	+	2	-	+	-	-	+	5	-	-	-	-	-	-

+, positive reaction; ±, weak reaction; -, negative reaction; ND, not determined.

ตารางที่ 4 Carbon utilization of selected actinomycete isolates

Isolate No.	Carbon source									
	Raffinose	Arabinose	Mannitol	Sucrose	Xylose	Cellobiose	Inositol	Rhamnose	Ribose	Glucose
RCU-178	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RY33-77	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
RCU-064	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+
RCU-050	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
RCU-197	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
RCU-043	-	+	+	-	±	±	+	+	+	+
RCU-049	-	-	+	-	-	+	±	-	-	+
RY33-9	-	-	+	+	+	+	±	-	+	+
RY33-4	-	-	±	+	-	-	-	-	-	+
RY17-7	-	-	-	-	-	±	ND	-	-	+
RY33-23	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
RY35-68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+, growth; ±, weak growth; -, no growth; ND, not determined.

Table 4 Carbon utilization of selected actinomycete isolates

Isolate No.	Carbon source									
	Raffinose	Arabinose	Manitol	Sucrose	Xylose	Cellobiose	Inositol	Rhamnose	Ribose	Glucose
RY33-27	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
RY9-5	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+
RCU-038	-	±	+	-	+	+	-	±	+	+
CU-103	-	±	+	-	+	++	±	+	++	+
RY35-45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RY35-23	±	+	±	±	-	+	-	+	-	+
RCU-180	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
RCU-201	-	+	+	-	+	+	-	+	±	+
RCU-224	±	+	+	+	+	+	+	±	±	+
RCU-111	-	-	-	-	-	++	-	-	++	+
RCU-181	-	-	+	-	±	+	-	+	-	+
RCU-182	±	-	±	-	+	+	±	+	-	+
RCU-213	-	+	-	±	+	+	-	+	+	+
RCU-050	-	±	+	-	±	+	++	-	+	+
RY45-3	-	++	-	-	++	-	-	-	++	+

ตารางที่ 5 16S rRNA gene sequence similarity (%) of isolates and closest actinomycete strain

Isolate no.	Nearest Relatives	Base pair	% Similarity
1.RCU-038	<i>Streptomyces demainii</i> B-1478	969	100
2.RCU-043	<i>Streptomyces lannensis</i> TA4-8	1300	100
3.RCU-049	<i>Streptomyces yunnanensis</i> YIM 4100	1274	99.37
4.RCU-050	<i>Streptomyces yunnanensis</i> YIM 4100	1263	99.37
5.RCU-064	<i>Streptomyces malaysiensis</i> NBRC 16446	1282	98.9
6.RCU-103	<i>Strep. thermoviolaceus</i> subsp. <i>apigens</i> DSM 41392	918	99.24
6.RCU-110	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> NBRC 101007	989	99.6
8.RCU-178	<i>Streptomyces ossamyceticus</i> CGMCC 41866	1293	100
9.RCU-197	<i>Streptomyces echinatus</i> NBRC 12763	1292	99.07
10.RY35-45	<i>Streptomyces parvulus</i> NBRC 13193	1269	99.45
11.RY35-77	<i>Streptomyces laurentii</i> LMG 19959	1309	99.39
12.RY42-14	<i>Streptomyces graminearus</i> NBRC 15420	1262	100
13.RCU-180	<i>Microbispora corallina</i> DF-32	1054	99.04
14.RCU-201	<i>Microbispora amethyltogenes</i> JCM 3021	1326	99.11
15.RCU-224	<i>Microbispora corallina</i> DF-32	1318	99.46
16.RY17-7	<i>Microbispora amethyltogenes</i> JCM 3021	1302	99.15
17.RY33-4	<i>Microbispora amethyltogenes</i> JCM 3021	1306	99.16
18.RY33-9	<i>Microbispora hainanensis</i> 211020	1258	98.89
19.RCU-181	<i>Microtetraspora glauca</i> DSM 43311	590	100
20.RCU-182	<i>Microtetraspora malaysiensis</i> H47-7	512	100
21.RCU-213	<i>Microtetraspora glauca</i> DSM 43311	1344	99.85
22.RY33-23	<i>Microtetraspora glauca</i> DSM 43311	929	99.68
23.RY35-68	<i>Actinomadura atramentaria</i> IFO 14695	1281	98.20
24.RY35-23	<i>Dactylosporangiumarangium darangshiense</i> DLS-44	1304	98.85
25.RY42-16	<i>Dactylosporangium salmonium</i> NRRL B-16294	1268	99.84
26.RY42-6	<i>Dactylosporangium salmonium</i> NRRL B-16294	1247	99.92

27.RY43-4	<i>Nocardia nova</i> JCM 6044	1226	99.84
28.RY9-5	<i>Actinoallomurus luridus</i> TT02-15	899	98.89

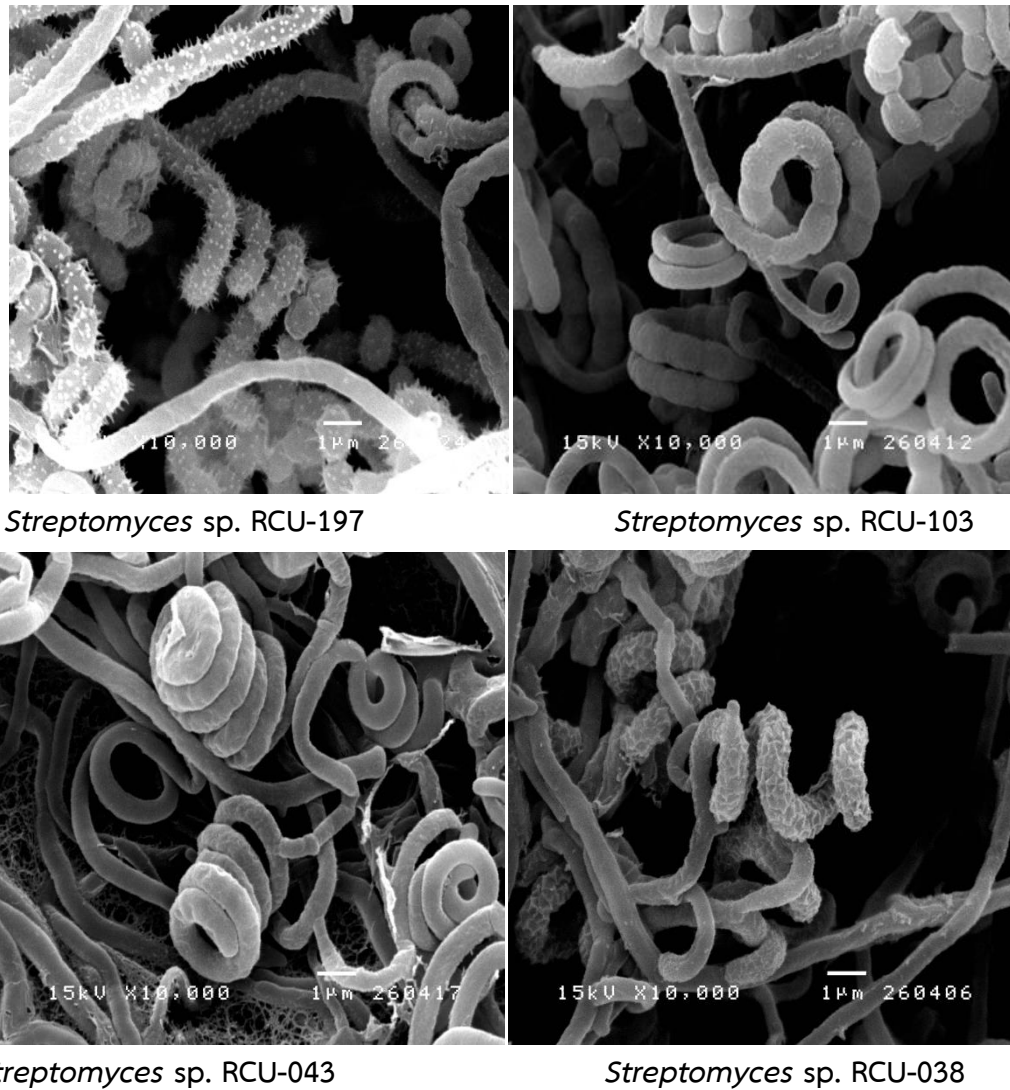
ตารางที่ 6 Candidate of novel species

Isolate no.	Nearest Relatives	Base pair	% Similarity
1.RCU-064	<i>Streptomyces malaysiensis</i> NBRC 16446	1282	98.9
2.RCU-197	<i>Streptomyces echinatus</i> NBRC 12763	1292	99.07
3.RCU-201	<i>Microbispora amethyltogenes</i> JCM 3021	1326	99.11
4.RY33-4	<i>Microbispora amethyltogenes</i> JCM 3021	1306	99.16
5.RY33-9	<i>Microbispora hainanensis</i> 211020	1258	98.89
6.RY35-68	<i>Actinomadura atramentaria</i> IFO 14695	1281	98.20
7.RY35-23	<i>Dactylosporaingiumarangsiense</i> DLS-44	1304	98.85
8.RY9-5	<i>Actinoallomurus luridus</i> TT02-15	899	98.89

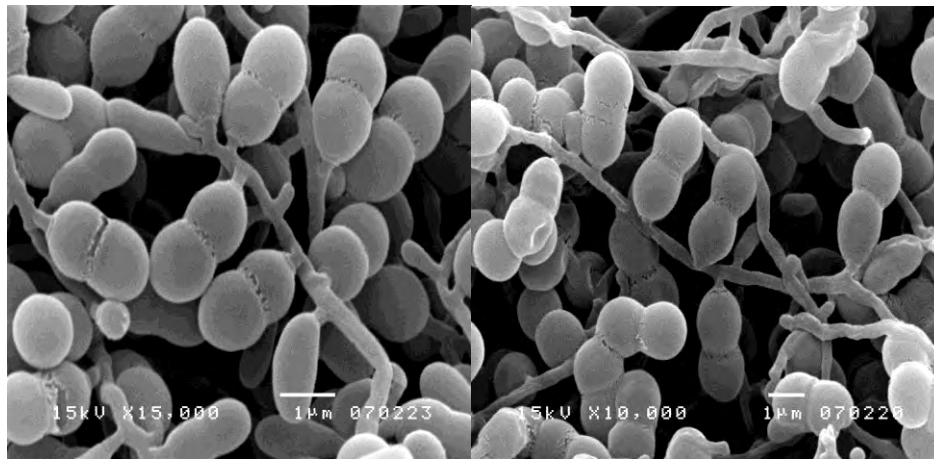
ตารางที่ 7 Antimicrobial activity of crude ethyl acetate extract of selected actinomycete isolates

Isolate no.	Concentration	Diameter of inhibition zone (mm)					
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
RCU-197	0.5 (mg/ml)	18.10	18.50	25.39	-	-	-
	1 (mg/ml)	19.75	19.25	27.40	-	-	-
RCU-049	0.5 (mg/ml)	-	-	-	-	-	-
	1 (mg/ml)	-	-	-	-	-	-
RCU-043	0.5 (mg/ml)	13.05	15.18	20.18	-	-	-
	1 (mg/ml)	13.75	15.18	20.18	-	-	-
RCU-178	0.5 (mg/ml)	-	-	-	-	-	-
	1 (mg/ml)	-	-	-	-	-	-
RCU-050	0.5 (mg/ml)	-	-	-	-	-	-
	1 (mg/ml)	-	-	-	-	-	-
RCU-038	0.5 (mg/ml)	16.55	9.93	16.83	-	-	-
	1 (mg/ml)	10.70	11.65	19.62	-	-	-
RCU-111	0.5 (mg/ml)	-	-	-	-	-	-
	1 (mg/ml)	-	10.45	9.0	-	-	-
RCU-103	0.5 (mg/ml)	-	-	-	-	-	-
	1 (mg/ml)	-	-	-	-	-	-
Positive control							
Penicillin G	10 Unit	31.63	ND	54.28	ND	ND	ND
Tetracycline	30 µg	ND	11.8	ND	ND	ND	ND
Ampicillin	10 µg	ND	ND	ND	15.35	ND	ND
Gentamicin	10 µg	ND	ND	ND	ND	15.15	ND
Nystatin	100 Unit	ND	ND	ND	ND	ND	15.0

-, no activity; ND, not determined



ภาพที่ 1 Scanning electron micrograph of *Streptomyces* strains



Microbispora sp. RY33-4

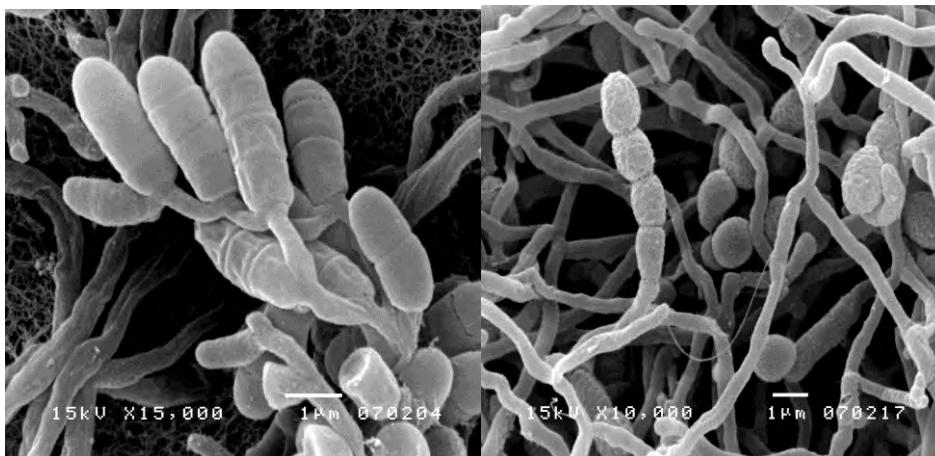
Microbispora sp. RCU-224



Microbispora sp. RY33-27

Microbispora sp. RY33-9

ภาพที่ 2 Scanning electron micrograph of *Microbispora* strains



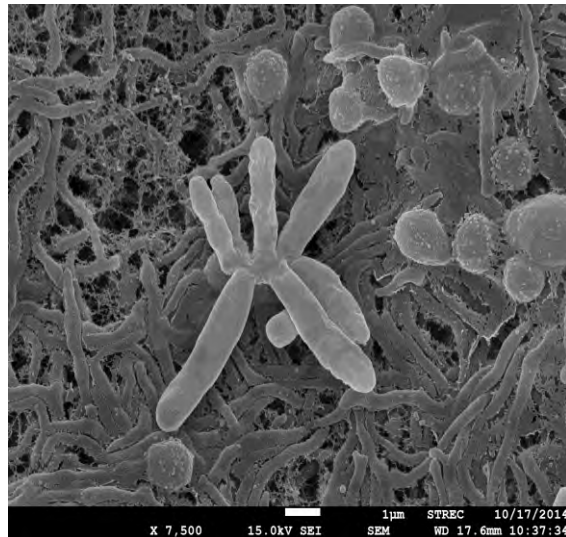
Microtetraspora sp. RCU-183

Microtetraspora sp. RCU-181

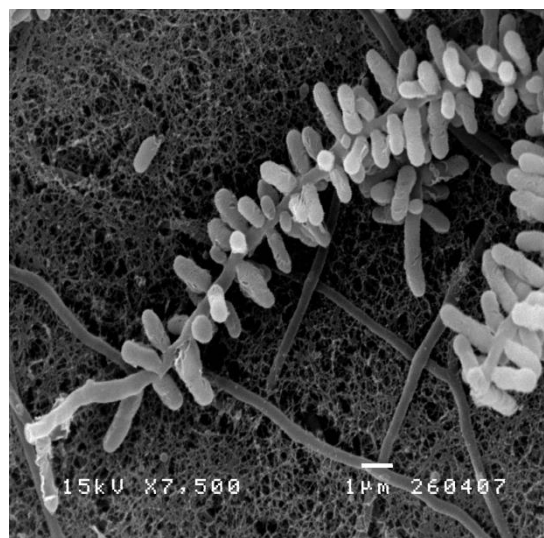
ภาพที่ 3 Scanning electron micrograph of *Microtetraspora* strains



ภาพที่ 4 Scanning electron micrograph of *Actinoallomurus* sp. RY9-5

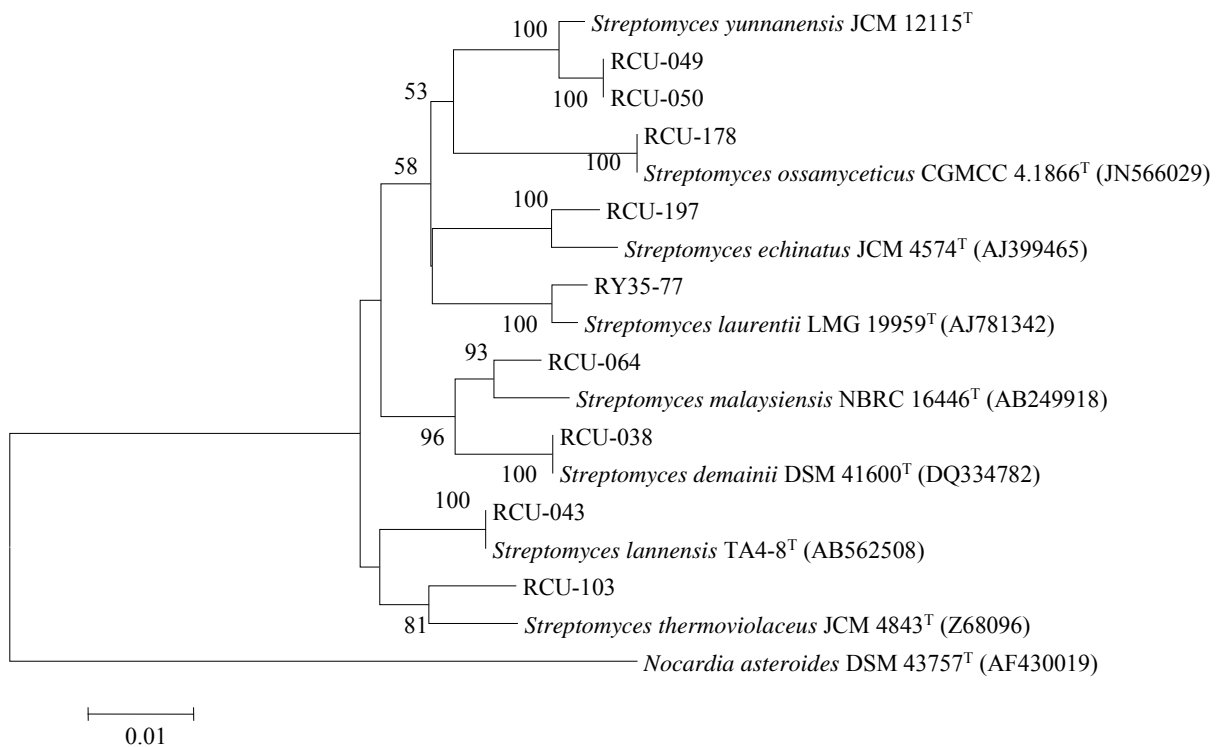


ภาพที่ 5 Scanning electron micrograph of *Dactylosporangium* sp. RY35-23

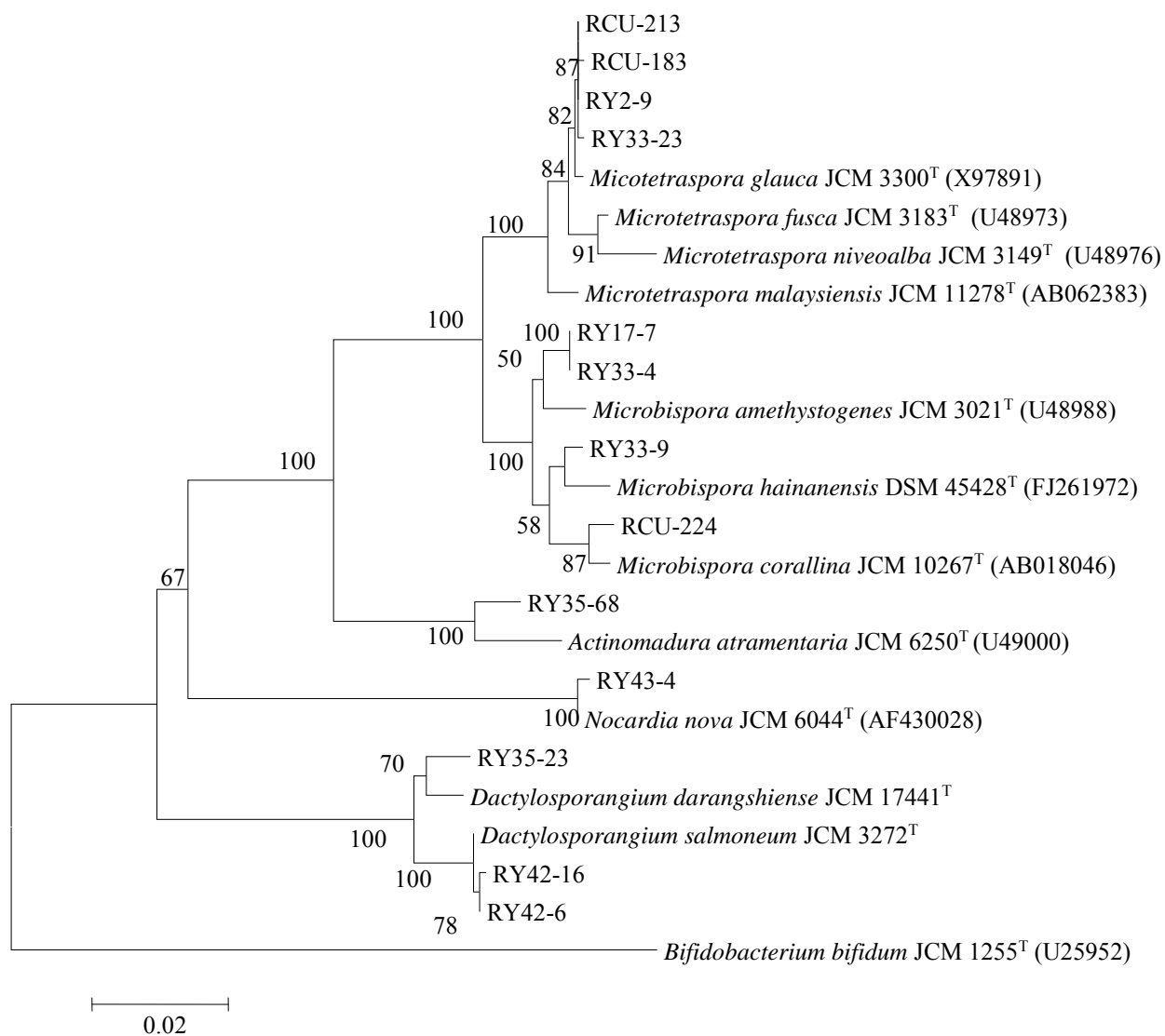


Actinomadura sp. RY35-68

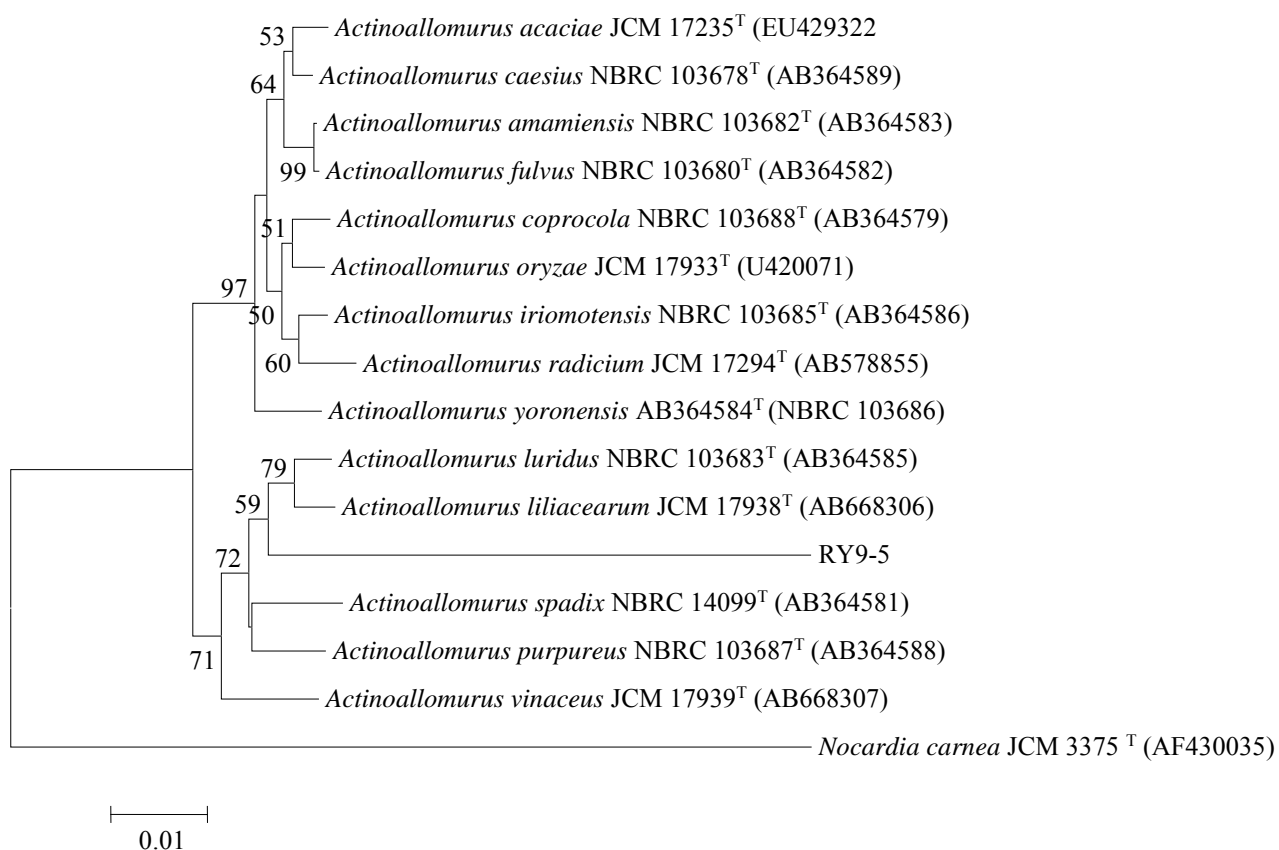
ภาพที่ 6 Scanning electron micrograph of *Actinomadura* sp. RY35-68



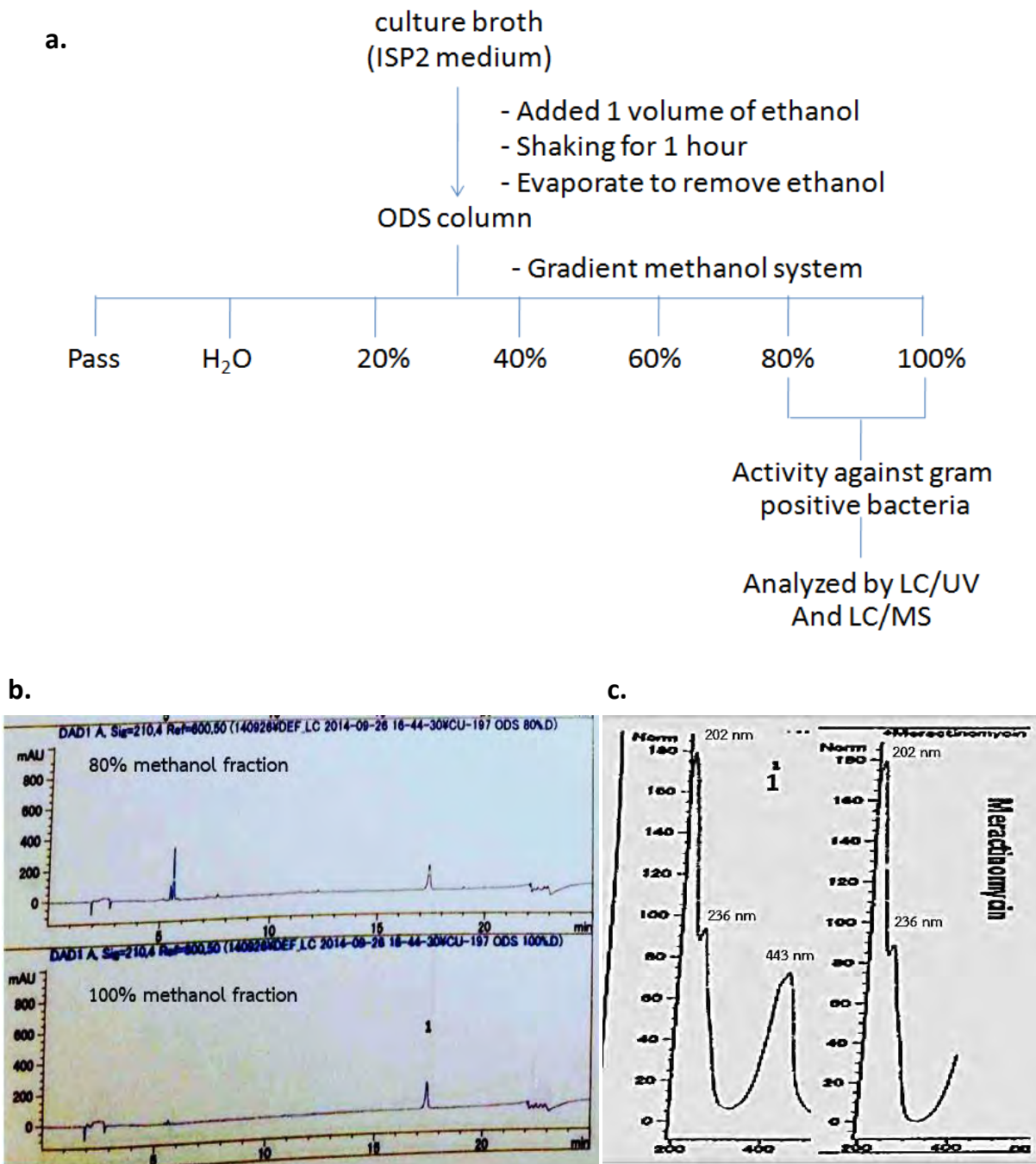
ภาพที่ 7 Neighbor-Joining Phylogenetic tree based on the almost complete 16S rRNA gene sequence of *Streptomyces* isolates. Number at branching point indicate bootstrap percentages (based on 1,000 replications)



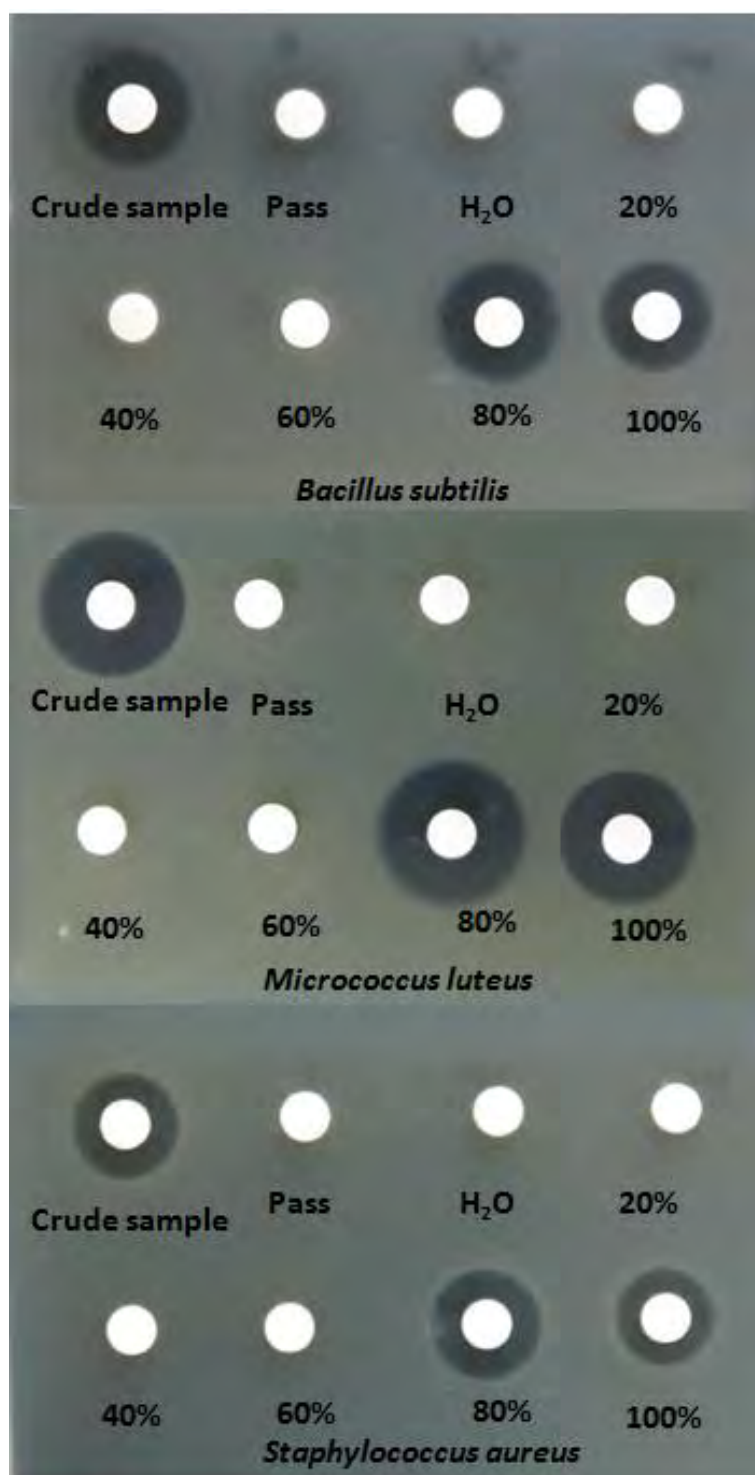
ภาพที่ 8 Neighbor-Joining Phylogenetic tree based on the almost complete 16S rRNA gene sequence of rare actinomycete isolates. Number at branching point indicate bootstrap percentages (based on 1,000 replications)



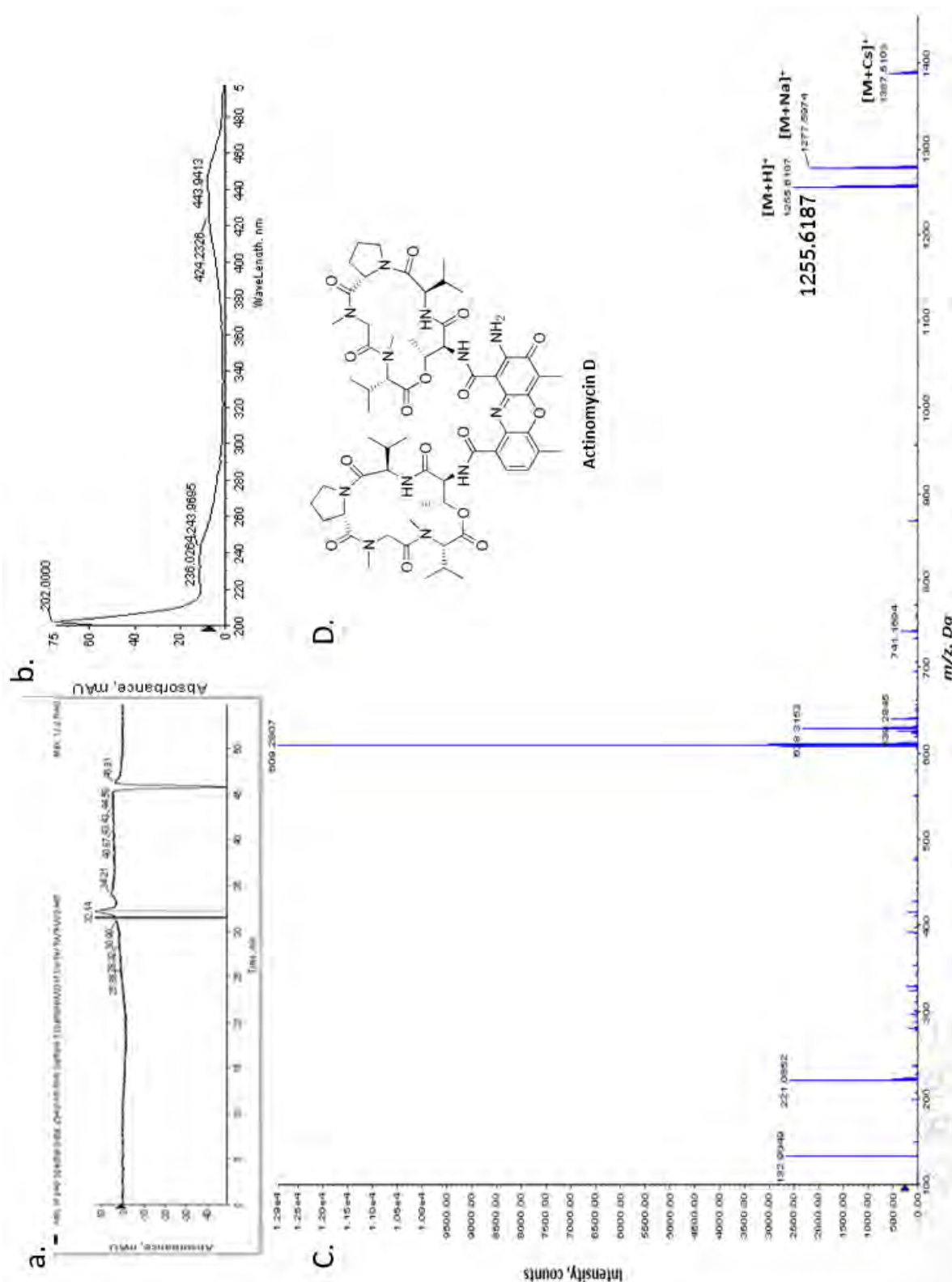
ภาพที่ 9 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on the almost complete 16S rRNA gene sequence of isolate RY9-5 and closely related *Actinoallomurus* species. Number at branching point indicate bootstrap percentages (based on 1,000 replications)



ภาพที่ 10 Isolation scheme of antibacterial compound from isolate RCU-197 (a), chromatogram of fraction 80% and 100% (b) and UV spectrum of peak 1 and meractinomycin (c).



ภาพที่ 11 Antibacterial activities of separated fraction of isolate RCU-197



ภาพที่ 12 HPLC profile ของสารสกัดใน fraction 100% methanol ของ *Streptomyces* sp.

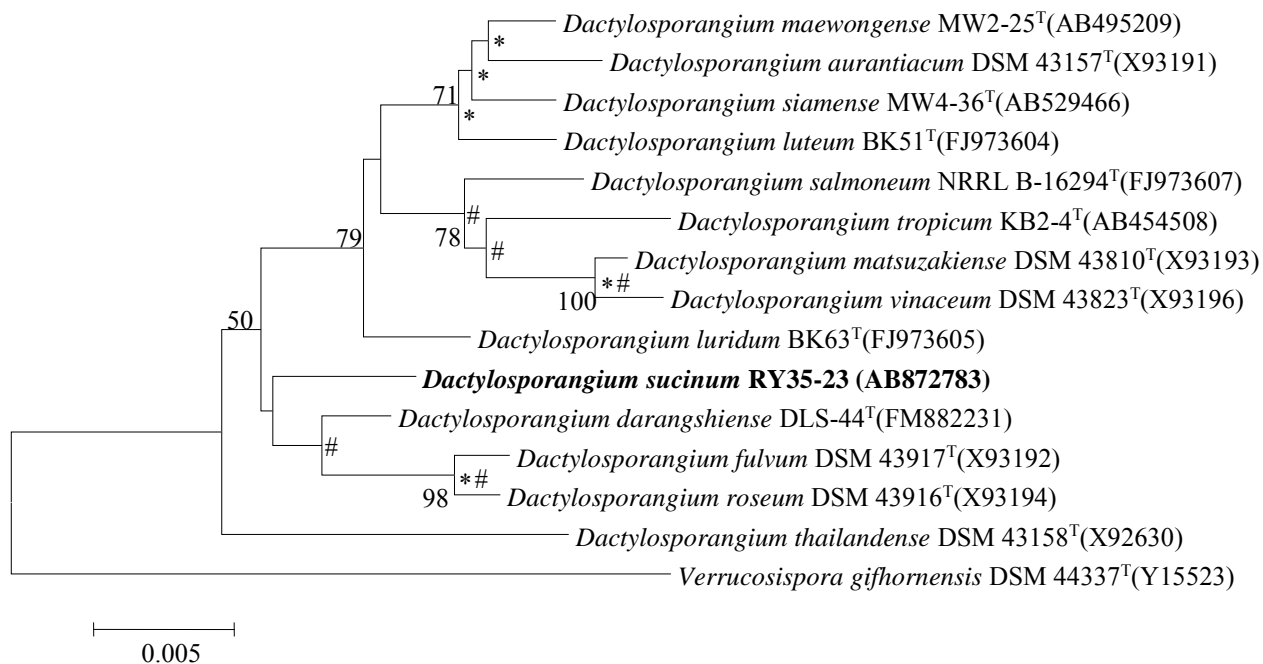
RCU-197 แสดง Single peak ที่เวลา 32.14 นาที (a), UV spectrum ของ peak ที่ 32.14 นาที แสดงให้เห็น λ_{\max} ที่ 202, 236 และ 443 nm, (c). mass spectrum ของ peak นาทีที่ 32.14 แสดงให้เห็นถึง [M+H]⁺ ที่ 1255.6187 ซึ่งเมื่อเทียบกับฐานข้อมูล Dictionary of natural products พบว่า LC/UV profile และ m/z ตรงกับ Actinomycin D (d).

4.4 ผลการศึกษาแอกติโนมัยสปิซิสใหม่

4.4.1 ลักษณะของ *Dactylosporangium* sp. RY35-23^T

จากการศึกษาอนุกรมวิธานเชิงลึกพบว่าแอกติโนมัยสปิซิส *Dactylosporangium* sp. RY35-23^T เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ต้องการอากาศในการเจริญ สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร ISP2 สามารถเจริญได้ปานกลางบนอาหาร ISP3 ISP4 และ ISP6 แต่เจริญได้น้อยบนอาหาร ISP5 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส และ pH 6-9 สามารถทนเกลือได้สูงสุดที่ 3% สามารถย่อยสลายแป้งแต่ไม่ย่อยสลายเจลาติน สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ (nitrate to nitrite) ให้ผล peptonization กับ skim milk เป็นบวก แต่ให้ผล coagulation เป็นลบ สามารถใช้น้ำตาล glucose, arabinose, D-mannose, D-xylose, D-mannitol, sucrose, melezitose, cellobiose แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล melibiose, arabitol, sorbose and raffinose

การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene พบว่า ไอโซเลต RY35-23^T มีความใกล้เคียงกับ *Dactylosporangium darangshiense*, *D. roseum* และ *D. fulvum* ที่ 98.86, 98.87 และ 98.94 ตามลำดับ นอกจากนี้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไอโซเลต RY35-23^T กับแบคทีเรียในสกุล *Dactylosporangium* ทั้งหมด พบว่า เชื้อ ไอโซเลต RY35-23^T ได้มีการอยู่ในเคลด (clade) เดียวกันกับ *Dactylosporangium darangshiense*, *D. roseum*, *D. fulvum* ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 Phylogenetic relationships based on neighbor-joining analysis (Saitou & Nei, 1987) of 16S rRNA gene sequences of strain RY35-23^T and all members in the genus *Dactylosporangium*. *Verrucosipora giffhornensis* DSM 44337^T was used as an out group. Asterisk (*, #) indicated the branches were recovered in the Maximum-Likelihood tree and

Maximum-Parsimony tree respectively. The number at branch nodes indicate bootstrap percentages derived from 1000 replications (only value > 50% are shown) Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า ไอโซเลต RY35-23^T มีการสร้าง substrate mycelia แผ่กระจายบนผิวอาหารแข็ง และไม่พบการสร้าง aerial mycelia นอกจากนี้ยังพบว่า ไอโซเลต RY35-23^T สามารถสร้าง sporangium จาก substrate mycelia MK9-(H₈) (63%) and MK9-(H₆) (21%) โดยมี sporangiophore ขนาดสั้นๆ นอกจากนี้ยังพบการสร้าง globose body ผิวเรียบที่มีลักษณะกลมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ไมโครเมตร กระจายอยู่ทั่วผิวอาหารแข็ง

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเชิงลึกพบว่า ไอโซเลต RY35-23^T มีไอโซเมอร์ของกรด diaminopimelic acid ชนิด meso-diaminopimelic acid และ 3-OH meso diaminopimelic acid ไม่พบกรด mycolic ที่ผนังเซลล์ น้ำตาลในเซลล์ประกอบด้วย hydrolysate contained rhamnose, ribose, galactose, mannose, glucose, arabinose และ xylose ที่เยื่อหุ้มเซลล์ มี polar lipids ที่ประกอบด้วย diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidyl glycerol, phosphatidylinositol และ phosphatidylinositol mannosides มี menaquinone ที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ นอกจากนี้ยังพบว่า cellular fatty acid ที่เป็นองค์ประกอบหลักประกอบด้วย C_{17:0}, C_{18:0}, C_{18:1} ω9c, anteiso-C_{15:0}, iso-C_{15:0}, iso-C_{16:0}, iso-C_{17:0}, anteiso-C_{17:0} ดังแสดงในตารางที่ 8 และมี G+C content 72.5 mol%

จากผลการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ลักษณะองค์ประกอบทางเคมี (chemotaxonomic characteristics) และ การวิเคราะห์ 16S rRNA gene สามารถสรุปได้ว่าแอคติโนมัยซีทไอโซเลต RY35-23^T เป็นแบคทีเรียในสกุล *Dactylosporangium*

เมื่อนำแอคติโนมัยซีทไอโซเลต RY35-23^T มาเปรียบเทียบกับ *Dactylosporangium* สายพันธุ์ใกล้เคียงพบว่า มีความแตกต่างกันทางลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics) หลายประการดังแสดงใน ตารางที่ 9 นอกจากนี้เมื่อนำ DNA ทั้งหมดของไอโซเลต RY35-23^T และสายพันธุ์ใกล้เคียงมาวิเคราะห์ความเข้ากันได้ของ DNA โดยวิธี DNA-DNA hybridization พบว่า DNA ของไอโซเลต RY35-23^T มีความเข้ากันได้กับ DNA ของสายพันธุ์ใกล้เคียงที่ค่าต่ำกว่า 70% (เป็นค่าที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการวัดเข้ากันได้ของ DNA หากมีค่ามากกว่า 70% จะถือว่าสิ่งมีชีวิตทั้งสองเป็น species เดียวกัน (Wayne et al., 1987)) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ RY35-23^T เป็นแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถแยกได้จากป่าพรุในประเทศไทย และได้ถูกตั้งชื่อว่า *Dactylosporangium sucinum* โดย specific epitete ในภาษาละติน มีความหมายว่าสีเหลืองทองอำพัน ซึ่งมาจากสีโคโลนีของ ไอโซเลต RY35-23^T

ตารางที่ 8 Cellular fatty acid compositions (%) of strain RY35-23^T and closely related *Dactylosporangium* species.

Fatty acid	RY35-23 ^T	<i>D. roseum</i> JCM 3364 ^T	<i>D. fulvum</i> JCM 5631 ^T	<i>D. darangshiense</i> JCM 17441 ^T
Saturated fatty acids				
C _{14:0}	-	1.1	2.6	-
C _{15:0}	0.5	1.2	1.4	0.3
C _{16:0}	1.0	7.8	10.1	1.3
C _{17:0}	5.1	3.0	0.6	1.3
C _{18:0}	1.9	4.7	9.6	1.8
C _{19:0}	0.7	0.2	0.4	-
Unsaturated fatty acids				
C _{16:1} ω7c	-	1.3	1.0	-
C _{18:1} ω9c	1.1	6.4	2.7	0.8
Branched fatty acids				
iso -C14:0	0.7	2.2	2.6	0.8
iso -C15:0	31.5	29.2	19.8	23.2
anteiso-C15:0	6.5	2.8	13.3	6.5
iso-C16:0	19.8	30.0	11.9	35.5
iso-C17:0	9.6	3.2	2.4	7.1
anteiso-C17:0	19.0	4.3	0.9	20.1
iso-C18:0	0.6	0.4	0.3	0.8
Summed in feature 8	1.6	2.2	1.2	0.4

-, not detected.

Summed in feature 8 comprises C_{18:1}ω8c.

ตารางที่ 9 Differential characteristics between strain RY35-23^T and closely related type strains of *Dactylosporangium* species

Characteristics	RY35-23 ^T	<i>D. roseum</i> JCM 3364 ^T	<i>D. fulvum</i> JCM 5631 ^T	<i>D. darangshiense</i> JCM 17441 ^T
Gelatin liquefaction	-	+	-	-
Skimmed milk coagulation	+	+	-	-
Starch hydrolysis	+	-	+	+
Nitrate reduction	-	+	-	-
Growth at pH 4	+	-	+	-
NaCl tolerance (%)	3	3	2	1
Acid production from				
Arabinose	+	-	w	+
Mannitol	+	-	+	+
Melezitose	+	w	+	+
Melibiose	+	-	-	+
Rhamnose	+	-	-	+
Salicin	+	w	+	-
Sorbose	w	-	+	-
Xylose	+	-	+	+
Utilization of				
Arabinose	w	w	-	+
Cellobiose	+	w	+	w
Mannitol	+	-	+	+
Mannose	+	+	w	+
Melezitose	w	-	w	w
Melibiose	-	-	-	w
Salicin	w	w	w	+
Sorbose	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	w
Xylose	+	-	+	+

+, positive; w, weakly positive; -, negative.

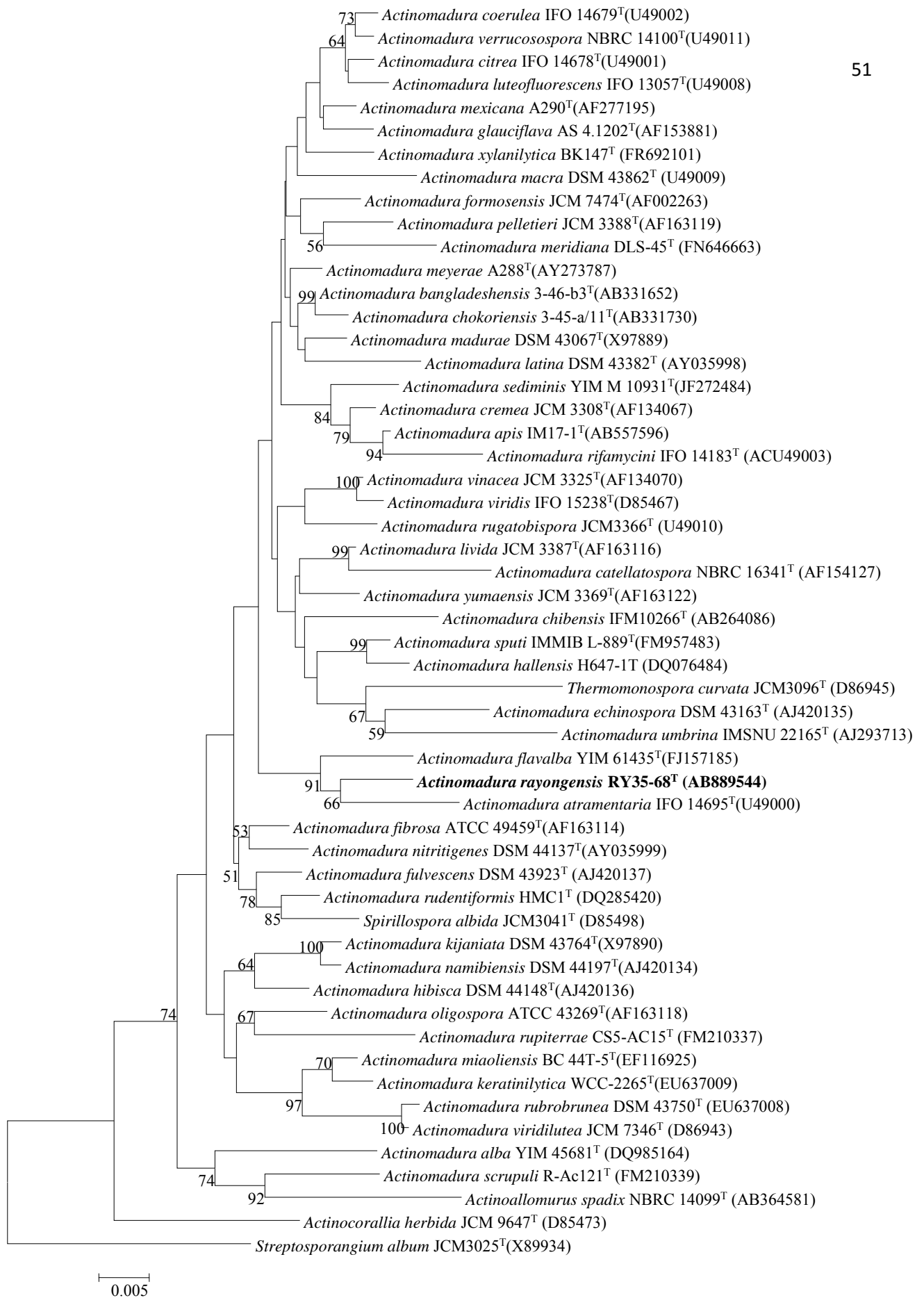
4.4.2 ลักษณะของ *Actinomadura* sp. RY35-68^T

จากการศึกษาอนุกรมวิธานเชิงลึกของเชื้อไอโซเลต RY35-68^T พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ต้องการอากาศในการเจริญ สามารถสร้างเส้นใย (mycelium) โดยพบได้ทั้ง aerial mycelium และ substrate mycelium พบการสร้างสปอร์เป็นแบบคู่ โดยมีการสร้างสายสปอร์สั้นๆ (2 สปอร์ต่อ 1 สาย) บน mycelium หลัก ลักษณะสปอร์มีผิวเรียบเป็นรูปทรงรีขนาด 0.5-0.7 ถึง 0.7-1 ไมโครเมตร ดังแสดงในภาพที่ 6

ไอโซเลต RY35-68^T เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส และที่ pH 4-9 สามารถใช้น้ำตาล D-glucose ได้ดีและสามารถใช้น้ำตาล D-cellobiose ได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล L-arabinose, D-arabitol, D-mannitol, D-mannose, D-melezitose, D-raffinose, D-sorbose, sucrose และ D-xylose สามารถย่อยสลายเจลาตินและ skimmed milk ได้ สามารถรีดิวซ์ nitrate เป็น nitrite ได้เล็กน้อย ไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนในน้ำนม และไม่สามารถย่อยสลายแป้งได้

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีพบว่าไอโซเลต RY35-68^T มีไอโซเมอร์ของกรด diaminopimelic acid ที่ผนังเซลล์เป็นแบบ meso-diaminopimelic acid และมีน้ำตาลภายในเซลล์คือ glucose, ribose, galactose และ madurose มี N-acyl type เป็นแบบ acetyl ไม่พบกรด mycolic ภายในเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์มี polar lipids หลักคือ phosphatidyl glycerol, phosphatidyl inositol, phosphatidylinositol mannosides มี cellular fatty acid ชนิดหลักคือ C16:0 (25.1%), iso-C16:0 (15.7%), C16:02-OH (7.3%), C17:0 (6.7%), C18:0 (9.7%), C17:1 ω6c (5.0%), C18:1 ω9c (6.1%), and C19:1cyc 11, 12/:1 (8.5%) (ตารางที่ 10) และพบว่า major menaquinone คือ MK-9(H6) (69%), MK-9(H8) (19%) and MK-9(H4) (12%)

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene พบว่า ไอโซเลต RY35-68^T มีความคล้ายคลึงกับ *Actinomadura atramentaria* ที่ 97.47% เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการร่วมกับ *Actinomadura* สายพันธุ์อื่นๆพบว่า ไอโซเลต RY35-68^T อยู่ร่วม node เดียวกันกับ *Actinomadura atramentaria* และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางฟิโนไทป์ยังพบว่า ระหว่างไอโซเลต RY35-68^T และ *A. atramentaria* มีความแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 11 นอกจากนี้การวิเคราะห์ความเข้ากันได้ของ DNA ยังพบว่า ไอโซเลต RY35-68^T มีความเข้ากันได้กับ *A. atramentaria* น้อยกว่า 70% ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า แอคติโนมัยซีทไอโซเลต RY35-68^T เป็นแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่ในสกุล *Actinomadura* โดยตั้งชื่อว่า *Actinomadura rayongensis* โดยในส่วนของ specific epithet มีความหมายถึงจังหวัดระยอง เพื่อเป็นเกียรติแก่จังหวัดระยองซึ่งเป็นสถานที่ที่เชื้อแอคติโนมัยซีทสายพันธุ์ใหม่นี้ได้ถูกค้นพบ



ภาพที่ 14 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ไอโซเลต RY35-68T กับสายพันธุ์ *Actinomadura* species อื่นๆ

ตารางที่ 10. Cellular fatty acid compositions (%) of strain RY35-68^T and *Actinomadura atramentaria* JCM 6250^T

Fatty acid	RY35-68 ^T	<i>A. atramentaria</i> JCM 6250 ^T
Saturated fatty acids		
C _{14:0}	-	3.0
C _{15:0}	2.9	5.9
C _{16:0}	25.1	26.8
C _{16:0} 2-OH	7.3	9.3
C _{17:0}	6.7	9.0
C _{18:0}	9.7	6.4
Unsaturated fatty acids		
C _{16:1} ω 7c	1.3	2.6
C _{16:1} ω 9c	0.1	0.2
C _{17:1} ω 6c	5.0	2.8
C _{18:1} ω 9c	6.1	0.6
C _{18:2} ω 6,9c	0.4	0.9
C _{19:1} ω 12c	0.9	0.9
C _{19:1} cyc 11, 12/ :1	8.5	0.9
Branched fatty acids		
iso-C _{10:0}	0.8	-
iso-C _{14:0}	1.5	0.5
iso-C _{16:0}	15.7	10.2
iso-C _{17:0}	0.3	0.7
iso-C _{18:0}	3.2	2.3
Summed in feature 6 ^a	0.3	-
Summed in feature 8 ^b	1.9	3.6
Summed in feature 10 ^c	-	0.5

^aSummed feature 6 comprises anteiso-C_{15:0} 3-OH

^bSummed feature 8 comprises C_{17:1} ω 8c

^cSummed feature 10 comprises iso-C_{17:0} 3-OH

ตารางที่ 11. Differential characteristics between strain RY35-68^T and *A. atramentaria* JCM 6250^T.

Characteristics	RY35-68 ^T	<i>A. atramentaria</i> JCM 6250 ^T
Growth on ISP2 medium		
Colour of colony	White	Dark brown
Reverse colony colour	Tan/Cream	Mustard brown
Diffusible pigment	None	Deep brown
Gelatin liquefaction	+	-
Acid production from		
D-Cellobiose	-	+
D-Mannose	-	+
L-Rhamnose	-	+
Utilization of		
D-Cellobiose	w	+
D-Mannose	-	w
Salicin	-	w

+,

positive; w, weakly positive; -, negative.

บทที่ 5

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

5. สรุปผลการวิจัย

ผลการคัดแยกได้แบคทีเรียแอกติโนมัยสีทจำนวน 77 สายพันธุ์ พบว่าสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็นสกุล *Streptomyces* จำนวน 35 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทหายาก (rare actinomycetes) ในสกุล *Micromonospora* จำนวน 4 สายพันธุ์ *Microtetraspora* จำนวน 6 สายพันธุ์ *Microbispora* จำนวน 9 สายพันธุ์ *Nocardia* จำนวน 4 สายพันธุ์ *Actinomadura* จำนวน 2 สายพันธุ์ *Nonomuraea* จำนวน 1 สายพันธุ์ *Dactylosporangium* จำนวน 2 สายพันธุ์ *Actinoallomurus* จำนวน 1 สายพันธุ์ และที่ยังไม่สามารถระบุสกุล (Unidentified) จำนวน 13 สายพันธุ์

แบคทีเรียแอกติโนมัยสีทที่แยกได้มีฤทธิ์ต้านจุลชีพทดสอบขั้นต้นจำนวน 41 สายพันธุ์ เป็นสกุล *Streptomyces* จำนวน 25 สายพันธุ์ *Micromonospora* จำนวน 1 สายพันธุ์ *Microtetraspora* จำนวน 1 สายพันธุ์ *Microbispora* จำนวน 6 สายพันธุ์ *Dactylosporangium* จำนวน 2 สายพันธุ์ *Actinoallomurus* 1 สายพันธุ์ และ Unidentified จำนวน 5 สายพันธุ์ ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดหยาบจาก *Streptomyces* 8 สายพันธุ์ที่คัดเลือก พบว่า 4 สายพันธุ์มีฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 และ *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (= *Kocuria rhizophila* ATCC 9341) จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rRNA gene ของ 29 สายพันธุ์ คาดว่า 8 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ ได้แก่ *Streptomyces* sp. RCU-064, *Streptomyces* sp. RCU-197, *Microbispora* sp. RCU-201, *Microbispora* sp. RY33-4ม , *Microbispora* sp. RY33-9, *Actinomadura* sp. RY35-68, *Dactylosporangium* sp. RY35-23 และ *Actinoallomurus* sp. RY9-5 ดังตารางที่ 6

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาสายพันธุ์ *Dactylosporangium* sp. RY35-23, *Actinomadura* sp. RY35-68 ทั้ง 2 สายพันธุ์ อย่างละเอียดแล้ว โดยได้เสนอตั้งชื่อเป็น *Dactylosporangium sucinum* และ *Actinomadura rayongensis* และบทความวิจัยทั้งสองได้ยอมรับการตีพิมพ์แล้วใน The Journal of Antibiotics และ International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology ตามลำดับ สำหรับสายพันธุ์ที่คาดเป็นแบคทีเรียแอกติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่จะได้ดำเนินการศึกษาให้สมบูรณ์ในโอกาสต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Arai, T. 1975. Culture media for actinomycetes. In The Society for Actinomycetes. Japan.
- Ballini, R. and Bosica, G. 1998. Synthesis of (E)-4-oxonon-2-enoic acid, a natural antibiotic produced by *Streptomyces olivaceus*. J. Nat. Prod. 61: 673-674.
- Berdy, I. 2005. Bioactive Microbial metabolites. J. antibiot. 58: 1-26
- Bertasso, M., et al. 2001. Bagremycin A and B, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. Tu 4128. J. Antibiot. 54(9): 730-736.
- Bordoloi, G. N., et al. 2001. Isolation and structure elucidation of a new antifungal and antibacterail antibiotic produced by *Streptomyces* sp. 201. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65(8): 1856-1858.
- Bouчек-Mechiche, K., et al. 2000. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France: description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. and *S. stelliscabiei* sp. nov. associated with Common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. associated with netted scab. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 91-99.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. and Yabuuchi, E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. Int J Syst Bacteriol 39: 224-229
- Goodfellow, M. and Williams, S. T. 1983. Ecology of actinomycetes. Ann. Rev. Microbiol. 37: 189-216.
- Goodfellow, M. and Simpson, K. E. 1987. Ecology of streptomycetes. Front. Appl. Microbiol. 2: 97-125.
- Hayakawa, M., et al. 1991. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. J. Ferment. Bioeng. 72: 320-326
- Hooper, A. M. and Rickards, R. W. 1998. 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid in antibiotic biosynthesis. XII. origin of the oxygen functionality of the ansamycin antibiotic actamycin. J. Antibiot. 51(10): 958-962.
- Igarashi, M., et al. 1998. Cremimycin, a new 19-membered macrocyclic lactam antibiotic from *Streptomyces* sp. J. Antibiot. 51(2): 123-129.
- Komagata, K. and Suzuki, K. 1987. Lipid and cell wall analysis in bacterial systematics. In

- Methods in Microbiology, 19: 161-207. London: Academic Press.
- Kumar, S., *et al.* 2001. MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. Bioinformat. 17(12): 1244-1245.
- Lackner, H., *et al.* 2000. Structures of five components of the Actinomycin Z complex from *Streptomyces fradiae*, two of which contain 4-chlorothreonine. J. Nat. Prod. 63: 352-356.
- Locci, R. 1989. Streptomycetes and related genera. In J. G. Holt (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: The Williams & Wilkins.
- Lorian, V. 1980. Antibiotics in Laboratory Medicine, pp. 161-207. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Matsumoto, N., *et al.* 1999. Lactonamycin, a new antimicrobial antibiotic produced by *Streptomyces rishiriensis* MJ773-88K4. J. Antibiot. 52(3): 269-75.
- Minnikin, D. E. *et al.*, 1984. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. J. Microbiol Methods 2: 233-241.
- Miyadoh, S. 1997. Atlas of actinomycetes. Japan: Asakura Publishing.
- Mukhopadhyay, T., *et al.* 1999. Mathemycin B, a new antifungal macrolactone from actinomycete species HIL Y-8620959. J. Nat. Prod. 62: 889-890.
- Nonomura, H. and Ohara, Y. 1969. Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil (Part 1). Journal of fermentation technology, 41: 463-469.
- Nonomura, H. and Ohara, Y. 1969. Distribution of actinomycetes in soil. VI. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil (Part 2) Classification of the isolates. Journal of fermentation technology, 41: 463-469
- Puseker, K., *et al.* 1997. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. 16: 155-198.
- Renner, M. K., *et al.* 1999. Cyclomarins A-C, new antiinflammatory cyclic peptides produced by a marine bacterium (*Streptomyces* sp.). J. Am. Chem. Soc. 121: 11273-11276.
- Saito, H. and Miura, K. 1963. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. Biochem. Biophys. Acta. 72: 619-629.

- Sasaki, O., *et al.* 2001. TPU-0031 A and B, new antibiotics of the novobiocin group produced by *Sterptomyces* sp. TP-A0556. J. Antibiot. 54(5): 441-447.
- Sasaki, O., *et al.* 2002. Cedarmycins A and B, new antimicrobial antibiotics from *Sterptomyces* sp. TP-A0456. J. Antibiot. 54(7): 567-572.
- Sasser, M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.
- Shiring, E. B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16: 313-340.
- Sitachitta, N., Gadepalli, M., and Davidson, B. S. 1996. New α -pyrone containing metabolites from a marine-derived actinomycete. Tetra. Lett. 52(24): 8073-8080.
- Speitling, M., *et al.* 1998. Demethyl mutactimycins, new anthracycline antibiotics from *Nocardia* and *Streptomyces* strains. J. Antibiot. 51(8): 693-698.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B. M.. 1994. Taxonomic note: A Place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 846-849.
- Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol Today 33, 152–155.
- Tamaoka, J. 1994. Determination of DNA base composition. In Chemical methods in prokaryotic systematics, pp. 463-470. England: John Wiley and Sons.
- Tang, Y. Q., *et al.* 2000. Feigrisolides A, B, C and D, new lactones with antibacterial activities from *Streptomyces griseus*. J. Antibiot. 53(9): 934-43.
- Taniguchi, M., *et al.* 2002. YM-181741, a novel benz[a]anthraquinone antibiotic with anti-*Helicobacter pylori* activity from *Sterptomyces* sp. J. Antibiot. 55(1): 30-35.
- Thawai, C., *et al.* 2004. *Micromonospora aurantionigra* sp. nov., Isolate from a peat swamp forest in Thailand. Ancinomycetologica. 18: 8-14
- Thawai, C., *et al.* 2005. *Micromonospora eburnea*. sp. nov., Isolate form a Thai peat swamp forest. Int. J. Syst. Bacteriol. 55: 417-422
- Thawai, C., *et al.* 2005. *Micromonospora siamensis* sp. nov., Isolated from Thai peat swamp forest. J. Gen. Appl. Microbial. 51: 229-234
- Thawai, C., *et al.* 2007. *Micromonospora narathiwatensis* sp. nov., from Thai peat swamp forest soils. J. Gen. Appl. Microbial. 53: 287-293

- Thawai, C., et al. 2010. *Actinaurispora siamensis* gen.nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 60: 1660-1666
- Tortora, G. J.; Funke, B. R.; and Case, C. L. 1995. Microbiology, an introduction (5thed.), pp. 290-291; 491-512. Bridge Parkway: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Songsumanus, A., et al. 2011. *Micromonospora humi* sp. nov., Isolated from peat swamp forest soil. Int. J. Syst. Bacteriol. 6: 1176-1181
- Vijaya Kumar, E. K. S., et al. 1999. Methylsulfomycin I, a new cyclic peptide antibiotic from a *Streptomyces* sp. HIL Y-9420704. J. Nat. Prod. 62: 1562-1564.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E. & other authors (1987). International committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on the reconciliation of approaches to bacterial systematic. Int J Syst Bacteriol 37, 463–464.
- Williams, S. T. and Cross, T. 1971. Actinomycetes: Slide and coverslip methods. In Method in microbiology (4th ed.), p. 320. London: Academic Press.

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Humic acid vitamin agar (HV agar)

Humic acid	1	กรัม*
Na ₂ HPO ₄	0.5	กรัม
KCl	1.71	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	กรัม
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	กรัม
CaCO ₃	0.02	กรัม
B-vitamins **		
Cycloheximide	50	มิลลิกรัม
Agar	18	กรัม
Distilled water	1	ลิตร
pH 7.2		

*Humic acid ละลายใน 10 ml ของ 0.2 N NaOH

**ประกอบด้วย 0.5 mg ของ thiamine-HCl, riboflavin, niacin, pyridoxine-HCl, inositol, Ca-pantothenate, p-aminobenzoic acid และ 0.25 mg ของ biotin

2. Arginine vitamin agar (AV agar) (Biotec culture collection)

Glucose	1	กรัม
Glycerol	1	กรัม
L-arginine	0.3	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.3	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
NaCl	0.3	กรัม
Trace elements ***	0.1	มิลลิลิตร
Agar	18	กรัม
B-vitamin	1	มิลลิลิตร
pH 6.4		

*** Trace element

CaCl ₂ ·2H ₂ O	4	กรัม
--------------------------------------	---	------

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2	กรัม
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0.1	กรัม
3. Yeast extract-malt extract agar (ISP 2 agar)		
Yeast extract	4	กรัม
Malt extract	10	กรัม
Glucose	4	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
	pH 7.0-7.2	
4. Sabouraud's dextrose agar (Difco)		
5. Tryptic soy agar (Difco)		
6. Peptone nitrate broth		
Peptone	1	กรัม
KNO ₃	0.1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
	pH 7.0	
7. Boullion gelatin broth		
Peptone	1	กรัม
Meat extract	0.5	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Gelatin	15	กรัม
	pH 7.0-7.2	
8. Basal medium agar (ISP 9)		
Carbon source	1	%
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64	กรัม
KH ₂ PO ₄ .anhydrous	2.38	กรัม
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	5.65	กรัม

MgSO ₄ .7H ₂ O	1.00	กรัม
Pridham and Gottlieb trace salts*	1	มิลลิลิตร
Distilled water	1	ลิตร
Agar	15	กรัม
ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.8-7.0		
*Pridham and Gottlieb trace salts		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.64	กรัม
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.11	กรัม
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.79	กรัม
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.15	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอกติโนมัยสีทที่คัดเลือก

>RCU-038

CACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATATGACTGCCGACCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGC
 CCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACTGGGACTGAGACA
 CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGG
 TTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGG
 GCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACTCCGGGTCTGCATT
 GATACGGGCGAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGGG
 ATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAACTAGG
 TGTGGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACG
 GGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACATCGGAAACCTCTGGAGACAGG
 GGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCC
 TGTGTTGCCAGCATGCCCTTTGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAAACCTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCATCATGCC
 CCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCG
 ATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCC

>RCU-043

AACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATACGAGCCTCCCGGCATCTGGGAGGTTGAAAAG
 CTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC
 GGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
 TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCA
 GCAGCCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTCGGATGTGAAAGCCCGGG
 GCTTAACTCCGGTCTGCAGTCGATACGGGCGAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGG
 AGGAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
 CGCCGTAACCGGTGGGCACCTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
 AGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACA
 TACACCGGAAACATCCAGAGATGGGTGCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCGTTGTCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAAACCTCGGAGGAAGGTG
 GGGACGACGTCAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCCTGAGGTGGAGCGAAT
 CTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATA
 CGTTCGCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAA

>RCU-049

GGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACGGGGTGCATGATCTCCGTGTGAAAGCTCCGGC
 GGTGAAGGATGAGCCCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAAGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA
 CTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGGA
 TGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
 CGGTAATACGTAGGGCGGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAA
 CCCGGTCTGCATTGATACGGGCGAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACAC
 CGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
 ACCTTGGGAACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGTCGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA
 ACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCCGG
 AAAACCGTGGAGACACGGTCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAAACCTCGGAGGAAGGTGGGGACGA
 CGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCAGGAGGTGGAGCGAATCTAAAA

AGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCC
GGCCTTGTACACACCCCGTC

>RCU-050

GGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACGGGGTCGCATGATCTCCGTGTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGG
CTATCAGCTTGTGGTGTAGGTAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAA
CCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCGAG
CGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTGCGATGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCGGGTCTGCATTGATACGG
GCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTCTG
GGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAC TAGGTGTGGG
GACATTCCACGTCGTCCTGCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCCGAAAACCGTGGAGACACGGTCCCC
CTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTGTGTT
GCCAGCATGCCTTCGGGGTGTAGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTAT
GTCTTGGGCTGCACAGTGTACAATGGCCGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGG
GGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGCT
CACGTCACGAAA

>RCU-064

ACACATGCAAGTGAACGATGAACCGTTTCGGCCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAG
CCCTGGAACCGGGTCTAATACCGGATACGACGCGTTCGCCATGGGATACGCGTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGCCTATCAG
CTTGTGGTGGGGTGTAGCCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAGCCTGATGCAGCGACCGCGTGAGGGATGACCGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTT
CAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTC
CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGGCTTGTGCGTGGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACTCCGGGTCTGCATTGATACGGGACGGC
TAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCCGA
TACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAC TAGGTGTGGGCGACATT
CCACGTTGTCCTGCCGACGCTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACA
AGCGGCGGAGCATGTGGCTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACATCGAAACTCAGAGATGGGTGCCCTTGTGG
TCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTGTGTTGCCAGCA
TGCCCTTCGGGGTGTAGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGG
GCTGCACAGTGTACAATGGCCGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTG
CAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGCTCACGTC
A

>RCU-103

CTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGAGCCGGGACCGCATGGTCTGGTTGGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGG
GCCTATCAGCTTGTGGTGTAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAGCCTGATGCAGCGACCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTGA
AACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGGAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGCGCA
AGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTGGTGTGAAAGCCCGGGCTTAACTCCGGGTCTGCAGTCGATA
GGGACAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTC
TGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGACTAGGTGTGG
GCAGCATTCCAGTGTCCGTGCCGACGCTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGG
CCCGACAAGCGCGGAGCATGTGGCTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGAAAACCTTCAAGAGATGGGTGCG
CCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCCTCAGCTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCCCGT
TTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTAT

TGCTTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGCCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGG
GGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAGTGTGCGGTGAATACGTTCCCGG

>RCU-110

GATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATACCACTTCGTCC
CGCATGGGACGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGT
AGCCGGCCTGAGAGGGGACCCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGGCCAA
CCCTGATGCAGCGACCCCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGGTTGTAACCTCTTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAG
AAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAACTACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGT
CGCGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGC
GGTGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACCCGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAGTGTGGTGGGACATTCCACGTCGTCGGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCC
GCCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAG
AACCTTACCAAGGCTTACATACACCGGAAAGCATCAGAGATGGTCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGG
GGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGACGACGTAAGTCAATCATGCCCTTATGTCTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGA
TGCTGTGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGAT
CAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACGTACGAAAGTCG

>RCU-178

GGGAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATACGACGCGCTCGGGCATCCGATGTGCGTGAAAGCTCCGG
CGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAACGGCTACCAAGCGCAGCAGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGACCCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACCCCGGTGAGGG
ATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGGCGGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTGCGTGGATGTGAAAGCCCGGGCTTAA
CCCCGGTCTGCATTGATACGGGAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACA
CCGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGGTGGGAAGTAGGTGTTGGCGACATTCACGTCGTCGGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTACATACGCCGG
AAAACCTGGAGACAGGGTCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGTGGTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAAC
GAGCGCAACCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGACGA
CGTCAAGTCAATGCCCCCTTATGTCTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCAGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGTGAGCGGAGCGAATCTCAAAA
AGCCTGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCAGTGTGCGGTGAATACGTTCCC
GGCCTTGTACACACCGCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAA

>RCU-197

TAACACGTGGGAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATATGAGCCGGAACCGCATGGTTCTGTTGTAAG
CTCCGGCGGTGAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGGCGACC
GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCG
TGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAGAGTACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCCGGCTGTACGTCGATTGTGAAAGCCCGAG
GCTTAACCTCGGGTCTGCAGTCGATACGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
GGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAACGGTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCACGTCGTCGGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTACATA
CACCGGAAACGCTGAGAGACAGGCGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGTGGTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACCCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTG
GGGACGACGTCAAGTCAATCATGCCCTTATGTCTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAGAGCTGCGATACCCTGAGGTGGAGCGAAT
CTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGG

>RY35-77

CGGGTGAGTAACACGCTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGAAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACCTGCCAAGGCATCTTGCGG
 GGTGGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGGCCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG
 AGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAACCTGATGCAGC
 GACGCCCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAAC
 TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGGGTGTGA
 AAGCCCGGGCTTAACCCGGGTCTGCATCCGATACGGGCGAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAG
 ATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
 GTAGTCCACGCCGTAACGTTGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCGCCCTGGGAGTACG
 GCCGCAAGGCTAAAACCTAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGC
 TTGACATATACCGAAACATCCAGAGATGGGTGCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCTGTCTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACAGGAGACCGCGGGGTCAACTCGGAG
 GAAGTGGGAGCAGCTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGTACAATGGCCGTACAAAGAGCTGCGATGCCGTGAGGGC
 GAGCGAATCTAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGC
 GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACGTACGAAAGTCGGTAAC

>RY42-14

CTGGGACAAGCCCTGAAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCATCTTGGGCATCCTTGATGGTGTAAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGG
 GCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
 CAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA
 AACCTCTTTCAAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGC
 AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTCGATTGTGAAAAGCTCGGGGCTTAACCCCGAGTCTGCAGTCGATA
 CGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCT
 CTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTGGGAACTAGGTGTT
 GGGCAGATTCACGTCGTCGGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCGCCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGG
 GCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTACATACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTGCC
 CCCTTGTGGTTCGGTGTACAGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTG
 TTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCGAAGTCATCATGCCCTTA
 TGTCTTGGGCTGCACACGTGTACAATGGCCGTACAATGAGTGTGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGCTCTCAGTTCGGATTGG
 GGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCGT
 CACGTCACG

>RCU-180

GGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
 CCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAATATTGCGAATGGGCGGAAGCCTGACGCGAGCGACCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGT
 AAACCTCTTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGCTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGGAGC
 GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTGCGCTGTCCGTGAAAAGCCCGTGGCTTAACCTACGGGTCTGCGGTGGATACGGG
 CAGGCTAGAGGCTGGTAGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGG
 GCCAGTCTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGGCTAGGTGTGGGGG
 TCTTCCACGATCTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCC
 CACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAAGCTCTGGAGACAGAGCCCTCCTT
 TGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTCAGCTCTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCATGTTGCC
 AGCACGCCCTTGGGGTGGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCGAAGTCATCATGCCCTTATG
 TCTTGGGCTGCAACATGCTACAATGGTTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGC

>RCU-201

GTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATACGACCATTTCTCGCATGGGATGGTGGT
 GGAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GCGACCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGAC
 GCCGCGTGGGGATGACGGCCTTCGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGC
 CAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGCGGAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTGCGTCTGCCGTGAAAGCCCG
 TGGCTAACTACGGTCTGCGGTGGATACGGGAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAG
 GAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGTGTAGTCC
 ACGCTGTAAACGTTGGGCGTAGGTGTGGGGTCTTCCACGACTTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGGAGTACGGCCGCA
 AGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTTTGACAT
 ACACCGGAAACACTCAGGAGATGGGTGCCTCCTTTGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGGTTAAG
 TCCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTCATGTTGCCAGCACGCCCTTTTGGGGTGGTGGGGGACTCATGGGAAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGG
 AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGTGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTCGATAACCTGAGGTGGA
 GCGAATCCCTAAAAGCGGCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGG
 TGAATACGTTCCCGGCCTGTACACACCGCCGTCACGTACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGG

>RCU-224

CGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATATGACACATGGTCGCATGAGCGGTGTGTGGAAAGTTTT
 TTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCCGGCC
 AACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACCCGCGTGGG
 GGATGACGGCCTTCGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
 GGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTTCGCTGTCGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTA
 CGGGTCTGCGGTGGATACGGGAGGCTAGAGGCTGGTAGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCG
 GTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAAC
 GTTGGGCGTAGGTGTGGGGTCTTCCACGATTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTC
 AAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTTTACATACACCGGAAACA
 CCCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCACAACGAGC
 GCAACCCCTGTTCATGTTGCCAGCACGCCCTTCGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGGATGACGTC
 AAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGTGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATGCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCC
 GGTCTCAGTTCGGAATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGG
 CCTTGTACACACCGCCGTCACGTACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCCAACCACTTGTGGGGGGGAGCGGTCGAAGGTGGGGCTGG
 CGATTGGGGACGAAGTCGTAA

>RY17-7

GTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGCCCTTCGGGTAAGTCTGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGG
 ATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATACGACCATTTCTCGCATGGGATGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTA
 TCAGCTTGTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGGGGATGACGGCCTTCGGTTGTAACCT
 CTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGGAGCGTTGTC
 CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTGCGCTGTCGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTGCGGTGGATACGGGAGGC
 TAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGCCAG
 TTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGTGTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCGTAGGTGTGGGGTCTTC
 CACGACTTCTGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAA
 GCGGGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTTTACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGGAC
 TGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTTGTTCATGTTGCCAGCAC
 GCCCTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGG

CTGCAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAA
CTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCCGTCACGTAC
GAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGC

>RY33-4

TGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGA
TAAGCCTGGGAAACCGGTCTAATACCGGATACGACCATTCTCGCATGGGATGGTGGTGAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGGGCCTAT
CAGCTTGTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTC
TTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACTGTAGAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCAGCGTTGTCC
GGAATTTATGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTGCGCTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTCGGTGGATACGGGCAGGCT
AGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGCCAGT
TCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCGTAGGTGTGGGGTCTTCC
ACGACTTCTGTCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAG
CGGGGAGCATGTTGCTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAACACTCAGAGATGGGTGCCTCCTTTGGACT
GGTGTACAGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCATGTTGCCAGCACG
CCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGC
TGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAATTGGGGTCTGCAA
CTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCCGTCACGTAC
GAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCCACCCTTTTTGGGGGGG

>RY33-9

TGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGA
TAAGCCTGGGAAACCGGTCTAATACCGGATACGACCATTCTCGCATGGGATGGTGGTGAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGGGCCTAT
CAGCTTGTGGTGGGGTATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTC
TTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACTGTAGAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCAGCGTTGTCC
GGAATTTATGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTGCGCTCTGCCGTGAAAGCCCGTGGCTTAACTACGGGTCTCGGTGGATACGGGCAGGCT
AGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGCCAGT
TCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCGTAGGTGTGGGGTCTTCC
ACGACTTCTGTCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAG
CGGGGAGCATGTTGCTAATTTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAAGCTCTGGAGACAGAGCCCTCCTTTGGACT
GGTGTACAGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCATGTTGCCAGCACG
CCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGG
GCTGCAAACATGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAATTGGGGTCTG
CAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCCGTCACG
TCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCCGTGGCC

>RCU-181

GCTGGCGCGGTGCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCT
GACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCATTTCCGGCATCCGATGGTGGTGAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGACT
CGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAATGGGCGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCTGGGGGATGACGGCCTTCGGGT
TGTAACCTCTTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACTGTAGAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCAA
GCGTTGTCCGGAATTTATGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTGCGCTCTGCCGTGAAAGCTTAGGGCTTAAACCTAGGTCTGCGGTGGATACG
GGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGT
GGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCGTAGGTGTGGG
GTGCTTCCACGTGTCCGTGCGGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCC

CGCACAAAGCGGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGTTTGACATACACCGGAAAGCTTCAGAGATGGAGCCCTCT
TCGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCATGTTGC
CAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAGTCATCATGCCCCATTATGT
CTTGGGTGCAAAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATGCCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGGATTGGGG
TCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCA
CGTCACGAAAGTCGGCAACCCGAAGC

>RCU-182

TTACGACTTCGTCACCAATCGCCAGCCCCACCTTCGACCGCTCCCCCGGAAACCGGTTGGGCCACGGGCTTCGGGTGTTGCCGACTTTCGTGAC
GTGACGGGGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCAGCATTGCTGATCTCGGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAG
ACCCCAATCCGAAGTACAGCCGGCTTTTAGGGATTGCTCCACCTCACGGTATCGCAACCCTCTGTACCGGCCATTGTAGCATGTTTGCAGCCCAAG
ACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGCAGTCTCCCATGAGTCCCCACCACCCAAAGGGCGTGTCTGG
CAACATGGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGACCACCTGTACACCAGTCCGAA
GAGGGCCCCATCTCTGAGGCTTCCGGTGTATGTCAAACCTTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTGAATTAAGCAACATGCTCCGCCGCTTGTGCGG
GCCCCGTCAATTCTTTGAGTTTAGCCTTGCAGCCGACTCCCCAGGCGGGCGCTTAATGCGTTAGCTACGGCGCGAAACCGTGGAAAGGTCCC
CACACCTAGCGCCCAACGTTTACAGCGTGACTACCAGGGTATTAATCCTGTTCCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGAAGTGGCCAGC
AAGCCGCTTCGCCACCGGTTCCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCGCTTGCCTTACCAGCCTTACGCTGCCCGTA
TCCACCGCAGACCTAGGGTTAAGCCCTAAGCTTTCAGGCGAGCGGACAAGCCACTACGAGCTCTTACGCCCAATAATCCGGACAACGCTTGC
GCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGCGCTTCTTACAGGTACACGTCAACTTCGTCCTGCTGAAAGAGGTTTACAACCC
GAAGGCCGTATCCCCACGCGGCGTGCCTGCGTCAGGCTTTCGCCATTGCGCAATATCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTC
TCAGTCCCAGTGTGGCCGCTCGCCCTCTCAGGCCGGTACCCGCTGCTGCGCTTGGTAGGCCACTACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGTCC
ATCCCAACCGAAAAAATTTCCACCACCATCGGATGCCGAAGTAGTCATATCCGGTATTAGACCCAGTTTCCAGGCTTATCCAGAGTCAGGGG
CAGGTTACTCAGTGTTACTACCCGTTCCGCCGCTCGAGTACCCGAAGGGCCTTTCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGC

>RCU-213

AGCGGCAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCATTTCCGGGA
TCCGATGGTGGTGGAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGC
CGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCGCAAT
GGGCGAAGCCTGACGACGCGACCGCGCTGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGTGTACCTGTAGA
AGAAGCGCCGCTAACTACTGTCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGAAGCGTTGTCCGGAATATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTT
GTCGCGTCTGCCGTGAAAGCTTAGGGCTTAACCTAGGTCTGCGGTGATACGGGAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGAAAGCGGAATTCCTGTTGTA
GCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGTGGCGAAGCGGCTTGTGGCCAGTTCGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAAC
AGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCGTAGGTTGGGGTGTCTCCAGCTGTCCCGTCCGCTAGCTAACGCATTAAGCGCC
CCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACCGGA
AGAACCTTACCAAGGTTTACATACACCGGAAAGCCTCAGAGATGGGGCCCTTTCGGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGCTGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGTTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCC
GGGGTCAACTCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCCATTATGCTTGGGCTGCAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTT
GCGATACCGTGAAGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTGCGAATTGGGGTGTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCG
CAGATCAGCAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCGTCACGTACGAAAGTCGGCAACCCCGAAGCCGTTGGCCCAAC
CGTTTTCCGGGGGGAGCGGTGAAAGGTGGGGCTGGCGATTGGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCCG

>RY33-23

GAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCATTTCCGGCATCCGATGGTGGTGG
AAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGC
GACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCGACGACGC
CGGTTGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGTTGACGCTGACCTGTAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGGTAATACGTAGGGCGAAGCGTTGTCGGGAATATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGCTTGTGCGCTGTCGGTGAAGCTTAGG
GCTTAACCTAGGTCTGCGGTGGATACGGCAGGCTAGAGGCTGGTAGGGGAAGCGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGA
GGAACACCGGTGGCGAAGCGGCTTGTGGGCCAGTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCAC

GCTGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCTCCACGTGCCGTGCTCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCGCTGGGGGAGTACGGCCGCAAG
 GCTAAAACCTAAAGGAATTACGCGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGTTGCTTAATTCAGCGCAACGGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATAC
 ACCGAAAGCCTCAGAGATGGGGCCCTCTCCGACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCCTTGTCCATGTTGCCAGCACGCCCTTTGGGGTGGTGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGG
 ATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCC
 TAAAAGCCGGTCTCAGTTCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAATGCTGCGGTGAATACGT
 TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGA

>RY35-68

CGCTGGCGCGTGTAAACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCC
 TGA CTCTGGGATAAGCCTGGGAAACCGGGTCTAATACCGGATACGACACTGACCGCATGGTGGGTGGTGGAAAAGTTTTTCGGTTGGGGATGGGCT
 CGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAAACGGCCTGAGAGGGCGACCGGTCACTGGGACTGAGACAC
 GGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGCGGAAGCCTGACGACGACGCCGGTGGGGATGACGGCTTCGGGT
 TGTAACCTCTTTTCAGCAGGGACGAAGCTAACGTGACGGTACCTGCGAAGAAGCGCCGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGGG
 CGAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGGCTTGTGCGTGGGTGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGGTCTGCACTC
 GATACGGGACGGTAGAGGCAGCTAGGGGAGCATGGAATTCGGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCGGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGG
 TGCTCTGGGGCTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGCGCTAGG
 TGTGGGGTCTTCCACGGGTTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACG
 GGGGCCCGCACAAAGCGGCGAGCATGTTGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATCACCGGAAATCCATCAGAGATGGT
 GGGTCTTTATCGGGCCGGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTT
 CCATGTTGCCAGCAGTGTGGTGGGGACTCATGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTA
 TGCTTGGGCTGCAACATGCTACAATGGCCGTACAGAGGGTCCGATACCGTGAAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGAATC
 GAAGTCTGCAACTCGACTTCGTGAAGTTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
 CCCGTACGTTACGAAAGTCGGCAACACCCGGAAGCCCGTGGCCCAACAGCAAAATGGGGGGGAGCGGGT

>RY35-23

CGCTGGCGCGTGTAAACATGCAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCT
 AGGCTTTGGGATAAACCTCGGAAACGGGGCTAATACCGGATATTCATGCTGGACGCATCGTCTGGTGTGAAAAGTTTTTCGGCCTGGGATGGGCT
 CGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACTGGGACTGAGACAC
 GGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTGCAATGGCGGAAGCCTGATGACGACGCCCGGTGAGGGATGAAGCCCTTCGGGT
 TGTAACCTCTTTTCAGCAGGGACGAAGCGTGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCGCCGGCAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAAGCGTAGGG
 CGCGAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGGCTTGTGCGTACGCTGTGAAAACCCGACGCTCAACTGTGGGCTTGACAGCTG
 ATACGGGACGGCTTGTGGTGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGG
 TCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCGCTAGGT
 GTGGGGGCTCTCCGGTCTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACG
 GGGGCCCGCACAAAGCGGCGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTACATGTTCCGGTAAATCCGGCAGAGATGTC
 GGGTCTTCCGGGCGGTTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTTCG
 ATGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGACTCATGAAAGTCCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTC
 CAGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGTACAAAGGGTGCATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGATCGGGGT
 CTGCAACTCGACCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC
 GTCACGAAAGTCGGCAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGGGTGGCG

>RY42-16

AGTAACCTGCCCCAGGCTTTGGGATAAACCTCGGAAACGGGGCTAATACCGAATATTCATTCTAGCGGCATCGTTGGGTGTGAAAAGTTTTTCGG
 CTTGGGATGGGCTCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACT
 GGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTGGGGAATTTGCAATGGCGGAAGCCTGATGACGACGCCCGGTGAGGGATG
 AAGGCCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCGCCGGCAACTACGTGCCAGCAGCCGG
 GTAAGACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGGCTTGTGCGTACGCTGTGAAAACCCGACGCTCAACTGT

GGGCTTGACAGTGATACGGGCAGGCTTGTAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGG
 TGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAACG
 TTGGGCGCTAGGTGTGGGGGCTCTCCGGTCTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTC
 AAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGTGCGCTAAAG
 CCGTGAGACACGGTGTCTTTCGGGGGCTTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTAGCTGTCGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGC
 GCAACCCCTTGTGATGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGACTCATGAAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATC
 ATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCAAAAAGCCGGTCTCAG
 TTCGATCGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACA
 CACCGCCCGTCACGTC

>RY42-6

GATAACCCTCGGAAACGGGGCTAATACCGAATATTCACTTCTAGCGGCATCGTTGGGTGTGGAAAGTTTTTCGGCTTGGGATGGGCTCGCGCCCTA
 TCAGTTGTTGGTGGGGTGTAGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC
 TCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGACGCGACCGCGTGAAGGATGAAGCCCTCGGGTTGTAACCT
 CTTTCGACAGGGACGAAGCGCAAGTACGCTGAGAGAAGCGCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAGACGTAGGGCGCGAGCGT
 TGTCGGGATTTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTGCGTCAGCTGTGAAAACCCGAGCTCAACTGTGGGCTTGCAGTGATACGGGGC
 GGCTTGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGC
 CGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGGGC
 CTCTCCGGTCTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGCCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGC
 ACAAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGTGCGCTAAAGCCGTGGAGACACGGTGTCTTCG
 GGGGCTTACAGGTGTTGATGGCTGTGTCGTAGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTTGTTCGATGTTGCCAG
 CGGTTCCGGCCGGGACTCATGAAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCA
 CGCATGCTACAATGGCCGGTACAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTGGAGCGAATCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGGATCGGGGTCTGCAACTCG
 ACCCGTGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCA

>RY43-4

CTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCACGGATCGCATGGTTTGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCGAGATGGGCCCGG
 GCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTACCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCC
 CAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGACGCGACCGCGTGAAGGATGACGGCCTTCGGGTTGTA
 AACCTCTTTCGACAGGGACGAAGCGCGAGTACGCTGATGAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGGC
 AGCGTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTTGTAGGCGGTTCTGCGCTGATTTGAAAACCTGACGCTCAACTGCAAGCTTGCAGTCGATAC
 GGGCGGACTAGAGTACTTACGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTC
 TGGGAAGTAACTGACGCTGAGAAGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTGGGTAAGTGTG
 GGTTCCTTCCACGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGG
 GCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACCCAGAAAGCCGTAGAGATACGGCC
 CCCTTGTGGTTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTAGCTGTCGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTTATCTTATG
 TTGCCAGCGCTAATGGCGGGACTCGTGAAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCA
 GGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGTGCATACCGTGAAGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCCGGATCGGGGTCT
 GCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCG

>RY9-5

AGCGGAAGGCCCTTCGGGACTCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTGGCTCTGGGATAAGCCCGGAAACTGGGTCT
 AATACCGGATACGACATTATCCGCATGGATCTGTGGGGAAAGTTTTTCGGCCAGGGTTGATTCCCGGCCTATCACCTGGTTGGTGGGGTGTGGG
 CTTACCAAGGCACCAACGGGTAGCCGGCTTGAAGGGCACCGGGCCCCACGGGAACGAAACCCGGCCAAACTCCTCCGGGAGGCAGCATGGGGG
 AATATGGCGCATGGGGCGAAAGCTGGACGCACCGACCCCGGGGGGAATGAAGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCACCAACAAACCGGAA
 GTTGACGGTAGGTGGGAAAAACCCCGCTAACTACGTGCCACACCCCGGTAATACGTAGGGCCCAACCGTTGTCCGAAATTTATGGGGCGTAA
 AAAGCTGAAGGCGGCCGTTGCGTCCGGCCGTGAAAACCCGGGCTTAACTCCGGGCTGGCGGTGAATACGGCCGAACTAAAGGTAGGTAGGGG
 AGAATGGAATTCGGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCGGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTTCTCTGGGCTTACCTGACGCTGAGGAG
 CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCTTTCACGGACTCCGTGCCG

CAGCTAACGCATTAAGCGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGTTG
CTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGTTTGACATCACCGGAAAAC TCGCAGAGATGCGGGGTCTTTTGGGCCGGTGACAGGTGGTGC
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCATGTTGCCAGCAACACCTTCGGGTGGTTGG
GGACTCATGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAAACATGCTACAAT
GGCCGGTACAGAGGGCTGCGAAACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTC
GGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGCAACACCC