

รายงานผลการจำแนกจุลินทรีย์ / IDENTIFICATION'S REPORT

ชื่อผู้ขอรับบริการ / Customer's name:	Mrs. Aranya Pinyorattanachot	เลขที่ / No. :	2017ID1106-073
หน่วยงานและที่อยู่ / Institute and address:	Probiotic and Herbal Co., Ltd. 59 Moo 5 Tambol Chamoung - - Pak Phanang Nakhon Si Thammarat Thailand 80330	วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date :	06 -- Nov -- 2017
		วันที่รายงานผล / Report date:	07 -- Feb -- 2018

ผู้ขอรับบริการส่งตัวอย่างเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกชนิด / The customer sent pure isolate for identification

ผู้ขอรับบริการส่งเป็นตัวอย่างเพื่อคัดแยกจุลินทรีย์และได้คัดเลือกมาจำแนกชนิด / The customer sent specimen for isolation and chose isolate(s) identification

ลำดับที่ No.	รหัสตัวอย่าง Code	วิธีการจำแนกชนิด Method of identification	มีความใกล้เคียงกับ Closely related with	% ความเหมือน % similarity	หมายเหตุ Note
1	MPRO1	Molecular method	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	99%	

เอกสารแนบ / Attachment:

(1) วิธีการวิเคราะห์ / Analytical method

(2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ / nucleotide sequence (s)

(3) ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ / Sequence similarity

(4) ภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ / Phylogenetic relationship

(5) เอกสารแนบอื่นๆ / other document

ผู้จัดทำรายงาน

Reported by:

(นางสาวทักษพร ธรรมรักษ์เจริญ)

(Ms. Tuksaporn Thummarukcharoen)

ผู้ตรวจรายงาน

Approved by:

(ดร. นัฐวุฒิ บุญยยืน)

(Dr. Nattawut Boonyuen)

Disclaimer:

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯ ไม่ใช่หน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ คราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯ ในการกล่าวอ้างใดๆ เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน
The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

วิธีการจำแนกชนิดรา

Method of fungi identification

1. DNA extraction

Genomic DNA was extracted from fresh mycelia using E.Z.N.A. Forensic DNA Isolation Kit (Omega Bio-Tek), following the manufacturer's manual.

2. PCR: ITS

The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified in a 50-ml reaction volume containing 1X buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μM of each primer (ITS1F and ITS4), and 1 U Taq DNA polymerase. The PCR temperature profile began with an initial denaturation at 96°C for 2 min, followed by 35 cycles of 96°C for 1 min, 53°C for 1 min and 72°C for 1:30 min. The final extension was carried out for 10 min at 72°C.

3. Gel Electrophoresis and Sequencing

PCR product was checked by 1% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and visualized under ultraviolet (UV) transilluminator. The PCR product was sent to be sequenced for both directions on an automated DNA sequencer (Macrogen Inc., Korea).

4. Sequence analyses

The nucleotide sequences obtained from all primers were assembled using Cap contig assembly program, an accessory application in BioEdit (Biological sequence alignment editor) Program (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). The sequences were compared with nucleotide sequences databases on Genbank, CBS or suitable databases.

References

- Doyle JJ and Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytoch. Bull.* 19: 11-15.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95-98. Available at [<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>]. Accessed July 25, 2008.
- Omega Bio-Tek, Inc. (2013). E.Z.N.A. Forensic DNA Kit: Standard protocol.: 6-9.
- Techaprasarn J. (2010). Genetic variation of *Kaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand based on chloroplast DNA (psbA-trnH and petA-psbJ) sequences. *Genetics and Molecular Research* 9 (4): 1957-1973.

Disclaimer:

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯไม่ใช่งานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆเว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน
The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

ลำดับนิวคลีโอไทด์
Nucleotide sequence(s)

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3')
No.	Sample No.	Nucleotide region of	Nucleotide sequence (5' -> 3')
1	MPRO1	ITS rDNA	GAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAACGAGTTCTGAAAGGGTTGTAGCTGGCCTCCGGGGCATGTGCACACCCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACCTTACTGTAGGTTTGGCGTGGGGCTTCGGGGCTCCGGGGCTCTGAGGCATTTCTGCCGGCCTATGTATCACTACAAACACATAAAGTAACAGAATGTATTCGCGTCTAACGCATCTAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGTGTCATGGAATTTCAACCCACACGTCCTTGTGATGTCGCGGGCTTGGATTTGGAGGCTTGTGGCCCTCTGCGGTCCGGCTCCTCTTGAATGCATTAGCTTGATTCGGTCCGGATCGGCCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAAGCGTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCTGTATGGGACAACCTTCTTGACATCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATA

Disclaimer:

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ไม่มีหน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งนี้ตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ในเอกสารอ้างอิงใดๆจนกว่าจะได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน

The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.

ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลสากล CBS
Comparison of nucleotide sequences with reference strain(s)

Strain: MPRO1

	Description	Max score	Total score	Query cover	Ident	Accession
1	<i>Trametes sanguinea</i> voucher CR35 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1182	1182	100%	99%	JN164981.1
2	<i>Trametes sanguinea</i> voucher PRSC95 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1177	1177	99%	99%	JN164982.1
3	<i>Trametes sanguinea</i> voucher M0138528 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1171	1171	100%	99%	KF573025.1
4	<i>Pycnoporus sanguineus</i> isolate 8R_1_2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1151	1151	97%	99%	FJ372672.1
5	<i>Trametes sanguinea</i> voucher M0138530 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1134	1134	96%	99%	KF573026.1
6	<i>Pycnoporus sanguineus</i> strain dd08098 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1133	1133	100%	98%	FJ810182.1
7	<i>Trametes sanguinea</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1127	1127	100%	98%	FJ478098.1
8	<i>Trametes sanguinea</i> strain 186 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1092	1092	96%	98%	KC525202.1

หมายเหตุ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ITS ของตัวอย่างรหัส MPRO1 กับฐานข้อมูลสากล GenBank จัดจำแนกได้เป็น *Trametes sanguinea* ซึ่งมีชื่อปัจจุบัน (Current name) คือ *Pycnoporus sanguineus*

Disclaimer:

ผลการตรวจสอบจากบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯไม่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งนี้ตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆเว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ ก่อน
The results obtained from the service are for the test specimens and specified condition only and cannot be used to certify the goods not tested. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) will not take any responsibility for any consequence or damage, which may result from information obtained from the service. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission from BIOTEC is prohibited.