

รายงานผลการจำแนกจุลินทรีย์ / IDENTIFICATION'S REPORT

ชื่อผู้ขอรับบริการ / Customer's name:	บริษัท โพรไบโอติกแอนด์เฮอรัล	เลขที่ / No. :	TBRC2017-010
หน่วยงานและที่อยู่ / Institute and address:	51 หมู่ 5 ต.ชะเมา อ.ปากหนัง จ.นครศรีธรรมราช 80330	วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date :	26 .- Sep .- 2016
		วันที่รายงานผล / Report date:	15 .- Nov .- 2016

ผู้ขอรับบริการส่งตัวอย่างดีเอ็นเอเพื่อจำแนกชนิด/The customer sent DNA samples 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	รากัลปิงหา	Molecular method	<i>Trichoderma reesei</i>	99%	
2	รารากไผ่	Molecular method	<i>Trichoderma asperellum</i>	100%	

เอกสารแนบ / Attachment:

- (1) วิธีการวิเคราะห์ / Analytical method
 (2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ / nucleotide sequence (s)
 (3) ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ / Sequence similarity

- (4) ภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ / Phylogenetic relationship
 (5) เอกสารแนบอื่นๆ / other document

ผู้จัดทำรายงาน

Report by:

(นางสาวทักษพร ธรรมรักษ์เจริญ)

(Ms.Tuksaporn Thummarukcharoen)

ผู้ตรวจรายงาน

Approve by:

(ดร.นัฐวุฒิ บุญยีน)

(Dr.Nattawut Boonyuen)

Disclaimer:

ผลการตรวจสอบจากบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯไม่ใช่หน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ 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 an 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 a modified CTAB method of Doyle and Doyle (1987).

1. Use a sterile spatula to scrape fungal mycelia from a culture plate into a microtube containing CTAB buffer (600 μ l).
2. Grind mycelia using the microtube pestle.
3. Incubate the microtube at 65 °C for 20 min.
4. Add 600 μ l of $CHCl_3$: IAA (24:1), and invert repeatedly.
5. Centrifuge at 13,000 rpm for 5 min at 4 °C.
6. Remove the upper aqueous phase to a clean microtube.
7. Add 300 μ l of cold isopropanol. Invert repeatedly and place at -20 °C for 20 min.
8. Centrifuge at 13,000 rpm for 15 min at 4 °C to pellet the DNA.
9. Discard supernatant. Add 50 μ l of 1x TE to dissolve DNA pellet.

2. PCR: ITS

The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified in a 50-ml reaction volume containing 1X buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.2 μ M of each primer (ITS5 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 0.8% 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) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใด ๆ ที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ไม่ใช่หน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ในการกล่าวอ้างใดๆ 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.

ลำดับนิวคลีโอไทด์
Nucleotide sequence(s)

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	บริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' -> 3')
No.	Sample No.	Nucleotide region of	Nucleotide sequence (5' -> 3')
1	รากัลปิงหา	ITS rDNA	AACAAGGTCCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCAATGTGAACGTTACC AATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTGCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGGATCCCATGGCGCCCGCGGAGGACCAAC TCAAACCTCTTTTTTCTCTCCGTCGCGGCTCCGTCGCGGCTCTGTTTACCTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACC CTAGCGGGCGTCTCGAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAACGCAGCGA AATGCGATAAGTAATGTGAATTCGAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCGCCCGCAGTATTCT GGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCTCGAACCCCTCCGGGGGTGCGGCTTGGGGATCGGCCCTCACCC GGGCCCGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGC GGCGCGCCACAGCCGTAACACCCCAAACCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAA GCATATCAATA
2	รารากไผ่	ITS rDNA	GTCGTAACAAGGTCCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCAATGTGAACGT TACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACAGGCGCCCGCGGAGGAACCAA CCAAACCTCTTTCTGTAGTCCCTCGCGGACGATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATCAAAATGAATCAAACTTTC AACAACGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTCGAGAATTCAGT GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCGCCCGCAGTATCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTTCAACCC TCGAACCCCTCCGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCGGCCCGCCGAAATACAGTGGCGGTCT CGCGGAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACAACTCGCACCGGGAGCGCGGCGTCCACGTCCGTAAAAACCCCAA CTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATA

ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์
Comparison of nucleotide sequences with reference strain(s)

Strain: รากกล้วยหา

	Description	Max score	Total score	Query cover	Ident	Accession
1	<i>Trichoderma reesei</i> isolate CTCCSJ-ASD50040 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1166	1166	100%	99%	KU896305.1
2	<i>Trichoderma reesei</i> isolate M10 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	1166	1166	100%	99%	KT336514.1
3	<i>Hypocrea</i> sp. 1 AE-2013 strain F4855 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	1166	1166	100%	99%	KF746114.1
4	<i>Hypocrea</i> sp. 1 AE-2013 strain F4813 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	1166	1166	100%	99%	KF746082.1
5	<i>Trichoderma reesei</i> strain IPBCC06_325 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	1166	1166	100%	99%	KC847188.1
6	<i>Hypocrea jecorina</i> strain ATCC 58353 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	1166	1166	100%	99%	JQ070073.1
7	<i>Hypocrea jecorina</i> strain CIB T118 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	1166	1166	100%	99%	EU280094.1
8	<i>Trichoderma reesei</i> strain QM6a 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	1166	1166	100%	99%	AF510497.1
9	<i>Trichoderma reesei</i> ITS region; from TYPE material	1166	1166	100%	99%	NR_120297.1
10	<i>Hypocrea</i> sp. 1 AE-2013 strain F4853 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	1164	1164	99%	99%	KF746112.1

หมายเหตุ: *Trichoderma reesei* เป็นชื่อปัจจุบัน (Current name) ของ *Hypocrea jecorina*

ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์
Comparison of nucleotide sequences with reference strain(s)

Strain: รารากไม้

	Description	Max score	Total score	Query cover	Ident	Accession
1	<i>Trichoderma</i> sp. CC-2016 strain S7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1123	1123	100%	100%	KX344997.1
2	Uncultured <i>Trichoderma asperellum</i> clone 15y-27 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	1123	1123	100%	100%	KU534625.1
3	<i>Trichoderma asperellum</i> isolate soil TR-1 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	1123	1123	100%	100%	KU203320.1
4	<i>Trichoderma asperellum</i> isolate C 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	1123	1123	100%	100%	KM456217.1
5	<i>Trichoderma asperellum</i> strain BHU-BOT-RYRL16 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	1123	1123	100%	100%	KR856222.1
6	<i>Trichoderma asperellum</i> strain LAHC-FFPK-M16 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	1123	1123	100%	100%	KF815050.1
7	<i>Trichoderma asperellum</i> strain Tr266B 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	1123	1123	100%	100%	KF737411.1
8	<i>Trichoderma asperellum</i> strain G 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	1123	1123	100%	100%	KF723005.1
9	<i>Trichoderma asperellum</i> strain HNXY1 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	1123	1123	100%	100%	JQ040316.1
10	<i>Trichoderma asperellum</i> strain HNCS4014 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	1123	1123	100%	100%	JQ040315.1

Disclaimer:

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลบริการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯไม่ใช่หน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ 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.