

รายงานผลการจำแนกจุลินทรีย์
IDENTIFICATION'S REPORT

ชื่อผู้ขอรับบริการ / Customer's name: นางอรรณภา ภิญโญรัตนโชติ	เลขที่ / No. : MY01-01
องค์กรและที่อยู่ / Institute and address: บริษัทโปรไบโอติกแอนด์เฮอรัเบิล จำกัด 59 ม.5 ต.ชะเมา อ.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช	วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date : 28 ธ.ค. 2558 วันที่รายงานผล/ Report date: 20 ม.ค.2559

ลำดับที่ No.	รหัสตัวอย่าง Sample code	วิธีการจำแนกชนิด Method of identification	ผลการจัดจำแนก Identify as	% ความเหมือน % similarity	หมายเหตุ Note
1	MY01-01	Molecular method	<i>Daldinia</i> sp.	99%	

โปรดทำเครื่องหมาย ในช่อง ที่ต้องการ
เอกสารแนบ : วิธีการวิเคราะห์ (Molecular method) ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequence)
(Attachment) ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (BLAST result)
 อื่นๆ (Other)

ผู้ปฏิบัติงาน รายงาน และวิเคราะห์ผล สลิพาน์ นวแก้ว
(Lab technician and Reporter) (นางสาวสลิลภาพร นวลแก้ว)
(Ms. Saillaporn Nuankaew)

ผู้ตรวจทานรายงาน ดร. นัฐวุฒิ บุญยีน
(Collator) (ดร. นัฐวุฒิ บุญยีน)
(Dr. Nattawut Boonyuen)

Disclaimer:

ผลการตรวจสอบเป็นผลจากการตรวจสอบสำเนาชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้น ไม่สามารถคาดการณ์ผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อการส่งผลการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลนี้ และไม่ปดทราว่าศูนย์ฯไม่ใช่นหน่วยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆทั้งสิ้น ตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆทั้งสิ้น เว้นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรก่อน

The results reported herein 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 this information. Please note that BIOTEC is not a certification body. Use of the Center name or symbol (Logo) in any case without written permission is prohibited.

MOLECULAR TECHNIQUE

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.

PCR: ITS

The internal transcribed spacer (ITS) region was amplified in a 50- μ l reaction volume containing 1X buffer, 2.5 mM MgCl₂, 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.

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).

ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ Internal Transcribed Spacer (ITS) ของ MY01-01

จากคู่ไพรเมอร์ ITS5/ITS4

5'-GTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGATCATTACTGAGTTATCTAAACTCCAACCC
TATGTGAAC TTACCGCCGTTGCCTCGGCGGGCCGCGTTCCGCCCTGTAGTTTACTACCTGGCGGGCGCG
CTACAGGCCCGCCGGTGGACTGCTAAACTCTGTTATATATACGTATCTCTGAATGCTTCAACTTAAT
AAGTTAAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATT
CTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCCCTGTTGCTTAGCGTTGGGAATCT
AGGTCTCCAGGGCCTAGTTCGCCAAAGTCATCGGCGGAGTCGGAGCGTACTCTCAGCGTAGTAATAC
CATTCTCGCTTTTGCAGTAGCCCCGGCGGCTTGCCGTA AAAACCCCTATATCTTTAGTGGTTGACCTC
GAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAA -3'

Length 575 bases

ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ITS ของ MY01-01

จากฐานข้อมูล GenBank

	Description	Max score	Total score	Query cover	Ident	Accession
1	Uncultured fungus clone L042882-122-062-B11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1062	1062	100%	100%	GQ999459.1
2	Fungal endophyte isolate 744 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	1057	1057	100%	99%	KR016835.1
3	Uncultured fungus clone LX042400-122-057-C11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1057	1057	100%	99%	GQ999540.1
4	Uncultured fungus clone L042883-122-063-D09 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1051	1051	100%	99%	GQ999495.1
5	Uncultured fungus clone L042882-122-062-C01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1051	1051	100%	99%	GQ999461.1
6	Uncultured fungus clone L042881-122-061-C05 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1051	1051	100%	99%	GQ999441.1
7	Fungal sp. ARIZ B463 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	1048	1048	100%	99%	FJ613058.1
8	<i>Daldinia eschscholtzii</i> isolate BPEF73 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	1042	1042	98%	99%	KF151849.1
9	<i>Sporothrix</i> sp. STD57 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	1042	1042	98%	100%	HM012821.1

	Description	Max score	Total score	Query cover	Ident	Accession
10	Uncultured fungus clone LX042400-122-057-D01 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	1029	1029	100%	99%	GQ999542.1
11	<i>Daldinia eschscholtzii</i> voucher MEL:2382609 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1027	1027	98%	99%	KP012954.1
12	<i>Daldinia eschscholtzii</i> genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	1027	1027	98%	99%	AB284189.1
13	<i>Daldinia</i> sp. PSU-ES97 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	1026	1026	97%	99%	JN116640.1
14	Fungal sp. FEX7 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	1022	1022	100%	99%	JN051359.1
15	<i>Sporothrix</i> sp. 4335 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	1022	1022	96%	100%	EU363038.1
16	<i>Daldinia</i> sp. BAB-5190 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	1020	1020	98%	99%	KT186172.1
17	<i>Daldinia</i> sp. BAB-4565 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	1020	1020	98%	99%	KR154932.1
18	<i>Daldinia</i> sp. 119CA/T 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, region	1020	1020	97%	99%	GU066682.1
19	<i>Daldinia</i> sp. BAB-5187 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	1016	1016	98%	99%	KT186170.1
20	<i>Daldinia</i> sp. BAB-4902 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	1016	1016	98%	99%	KR155005.1

หมายเหตุ

เมื่อนำลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ของ MY01-01 เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าจัดอยู่ใน Phylum: Ascomycota, Sub-phylum: Pezizomycotina, Class: Sordariomycetes, Order: Xylariales, Family: Xylariaceae และจัดอยู่ใน Genus: *Daldinia* แต่จากข้อมูลที่มียังไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนกถึงระดับ species ต้องอาศัยข้อมูลลักษณะของดอกสดที่พบในธรรมชาติประกอบกันด้วย