

รายงานผลการจำแนกจุลินทรีย์ / IDENTIFICATION'S REPORT

ชื่อผู้ขอรับบริการ / Customer's name:	บริษัท โพรโมโอดีค แอนด์ เฮลท์แคร์ จำกัด	เลขที่ / No. :	TBRC-2017-182
หน่วยงานและที่อยู่ / Institute and address:	55 หมู่ 5 ตำบลชะเมษา อำเภอปากพะนึ่ง นครศรีธรรมราช 80330	วันที่ได้รับตัวอย่าง / Sample receive date :	8 - Mar -2017
		วันที่รายงานผล/ Report date:	24 - May - 2017

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	K	Molecular method	<i>Neurospora</i> sp.	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

Reported by:

(นางสาวทักษพร ธรรมรักษ์เจริญ)
(Ms.Tuksaporn Thummarukcharoen)

ผู้ตรวจรายงาน

Approved by:

(ดร.นัฐวุฒิ บุญยีน)
(Dr.NattawutBoonyuen)

Disclaimer:

ผลการตรวจสอบจากบริการนี้เป็นผลการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่บอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯไม่ใช่นายงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆในแง่ใดที่รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ 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. NationalCenter 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 fungiidentification

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) จะไม่รับผิดชอบต่อการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์และไปรพรทบว่าศูนย์ฯไม่ให้น้ำยงานที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นขอสงวนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆเป็นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ 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. NationalCenter 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	K	ITS rDNA	GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGCTCCGTTGGTGAACCGGAGGGATCATTACAGGTTGCAAAACTCCACAA ACCATCGCGAATCTTACCGGTACGGTTGCCICGGCGCIGGCGGTCGGGAAAGGCCCTCGGGCCCTCCCGGATCCICGG GTCTCCCGCTCGCGGGAGGCTGCCCGCGGAGTGCCGAAACTAAACTCTTGATATTTTATGTCTCTCTGAGTAAACTT TTAAATAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAGCAGCGAAATGGGATAAGTAA TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGGCTCGCCAGTATTCCTGGCGAGCATCCCTG TTCSAGGGICATTTCAACGATCAAGCTCTGCTTGGGTTGGGGATCCGCGCTGTCCGGGTCCCTCAAAATCAGTGGC GGGCTCGGTAGTCACACCGAGCGTAGTAACTACATCGCTATGGTCGTGGCGCGGTTCTTGGCGTAAACCCCGCA TTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCGCTGAACCTTAAGCATATCATA

Disclaimer:

ผลการตรวจสอบจากงานบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับชิ้นตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดคะเนผลที่นอกเหนือจากนี้ได้ ทั้งนี้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลแห่งการกระทำหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และไปรหรือทราบว่าศูนย์ฯไม่ใช่นายจ้างที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นยกตขบไปมอบญาติให้ใช้ชื่อ ศูนย์หรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆเช่นแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ 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. NationalCenter 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.

ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์
Comparison of nucleotide sequences with reference strain(s)

Strain: K

#	Reference description	Score	Similarity	Overlap%
1	Biol 2200 14682616000000054 DTO 131-B5 16235766 1468261600000009 131-B5 Neurospora intermedia ITS <i>Neurospora intermedia</i> NLink1309: ITS	954.147	100	99.668
9	<i>Neurospora crassa</i> isolate SMS0...	941.468	100	98.342
10	SH113365.06FU AY681192 Fungi,Ascomycota,Sordariomycetes,Sordariales,Sordariaceae,Neurospora, <i>Neurospora intermedia</i>	931.958	100	97.347
11	<i>Neurospora intermedia</i> strain C...	931.958	100	97.347
12	CBS 131.92 AY681192 <i>Neurospora intermedia</i> , Indonesia, n3: rDNA sequences ITS	931.958	100	97.347
13	CBS 131.92 gb - AY681192 - CBS 131.92 - <i>Neurospora intermedia</i> 18S ribosomal RNA gene partial sequence;internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA gene andinternal transcribed spacer 2 complete sequence; and 28S ribosomalRNA gene partial sequence. - cgtaac' target='_blank'>>gb - AY681192 - CBS 131.92 - <i>Neurospora intermedia</i> 18S ribosomal RNA gene partial sequence;internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA gene andinternal transcribed spacer 2 complete sequence; and 28S ribosomalRNA gene partial sequence. - cgtaac <i>Neurospora intermedia</i> , Indonesia, n3: rDNA sequences ITS	931.958	100	97.347
16	CBS 268.36 <i>Neurospora intermedia</i> , USA, n3: rDNA sequences ITS	930.373	100	97.181
17	<i>Neurospora crassa</i> 18S ribosoma...	950.978	99.834	99.668
34	CBS 280.48 <i>Neurospora crassa</i> , California, n3: rDNA sequences ITS	938.298	99.831	98.342
38	SH113365.06FU AY681193 Fungi,Ascomycota,Sordariomycetes,Sordariales,Sordariaceae,Neurospora, <i>Neurospora crassa</i>	928.788	99.83	97.347
39	<i>Neurospora tetrasperma</i> strain ...	928.788	99.83	97.347
40	<i>Neurospora crassa</i> strain ICMP ...	928.788	99.83	97.347
41	SH113365.06FU AY681194 Fungi,Ascomycota,Sordariomycetes,Sordariales,Sordariaceae,Neurospora, <i>Neurospora tetrasperma</i>	928.788	99.83	97.347
42	CBS 232.56 <i>Neurospora crassa</i> , Netherlands, n3: rDNA sequences ITS	927.203	99.829	97.181
43	CBS 367.70 <i>Neurospora crassa</i> , Unknown, n3: rDNA sequences ITS	924.033	99.829	96.849
46	CBS 169.90 <i>Neurospora torii</i> , Brazil, n3: rDNA sequences ITS	922.448	99.828	96.683
49	<i>Neurospora</i> sp. isolate A490P12...	911.353	99.826	95.522

หมายเหตุ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ITS ของ A01 กับฐานข้อมูลสากล GenBank แล้วจัดจำแนกให้เป็น *Neurospora* sp. เนื่องจากมีความใกล้เคียงกับราหลายชนิดในสกุล *Neurospora* ไม่สามารถจัดจำแนกถึงระดับชนิดโดยใช้ข้อมูล ITS เพียงอย่างเดียวได้

Disclaimer:

ผลการตรวจสอบจากบริการนี้เป็นผลจากการตรวจสอบสำหรับตัวอย่างที่ได้รับภายใต้สภาวะที่ระบุไว้เท่านั้นไม่สามารถใช้คาดการณ์ผลเชิงลึกหรือผลเชิงพาณิชย์ (ใบไอเทค) จะไม่รับผิดชอบต่อผลการตรวจหาหรือความเสียหายใดๆที่เกิดจากข้อมูลผลการวิเคราะห์ และโปรดทราบว่าศูนย์ฯไม่ใช่นักวิจัยที่มีอำนาจในการรับรองผลการตรวจสอบใดๆ ทั้งสิ้นตลอดจนไม่อนุญาตให้ใช้ชื่อ ตราหรือสัญลักษณ์ของศูนย์ฯในการกล่าวอ้างใดๆในแต่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากศูนย์ฯ 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. NationalCenter 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.