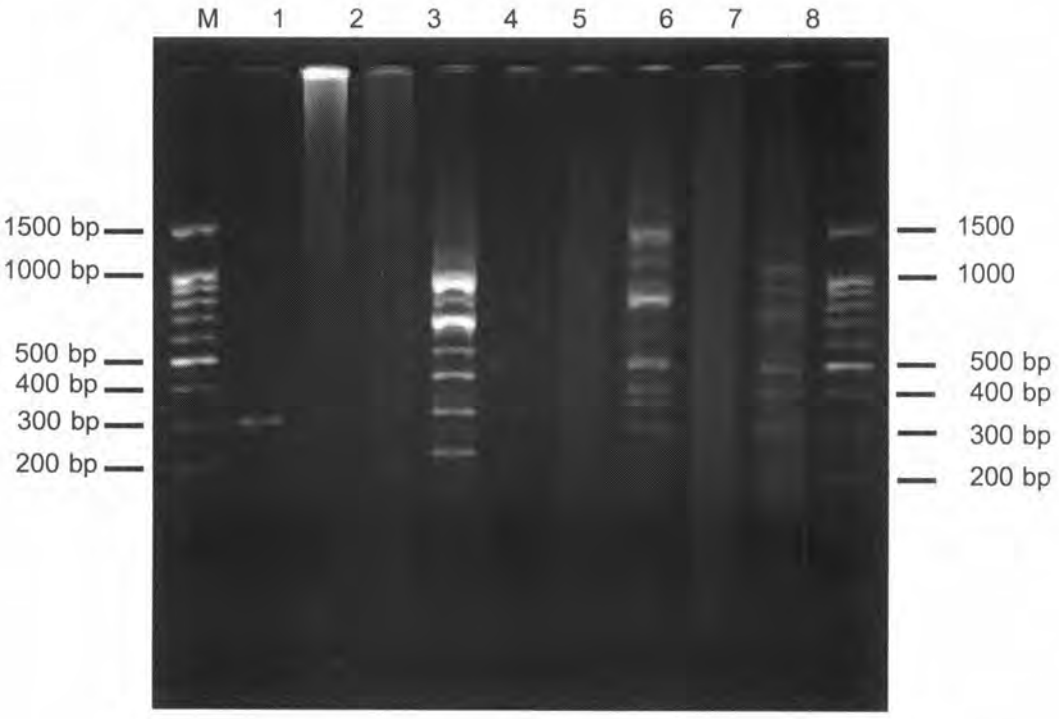
บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ของเห็ดเผาะ

การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ของเห็ดเผาะ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซเทลไลต์ ได้แก่ $(AG)_8T$ $(CA)_8G$ $(GT)_8C$ $AC(CA)_6CYG$ $CRN_2(CTT)_5$ $(CAA)_8$ $(GTC)_5$ $(GCT)_5$ และ $(AC)_{10}$ ตรวจสอบผลบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธีเดียมโบรไมด์ พบว่าไพรเมอร์ $CRN_2(CTT)_5$ ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ได้ ไพรเมอร์ $(AC)_{10}$ ไพรเมอร์ $(GTC)_5$ และไพรเมอร์ $AC(CA)_6CYG$ สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ได้หลายชิ้นส่วน ไพรเมอร์ $(AG)_8T$ สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ได้เพียง 1 ตำแหน่ง ส่วนไพรเมอร์ $(CA)_8G$ ไพรเมอร์ $(GT)_8C$ ไพรเมอร์ $(CAA)_8$ และไพรเมอร์ $(GCT)_5$ สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป็นปื้นบาง ๆ (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ของเห็ดเผาะ ด้วยไพรเมอร์ไมโครแซเทลไลต์ต่าง ๆ ตรวจสอบผลบน อะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ช่อง 1-9 คือ ผลเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนไอเอสเอสอาร์ ด้วยไพรเมอร์ $(AG)_8T$ $(CA)_8G$ $(GT)_8C$ $AC(CA)_6CYG$ $CRN_2(CTT)_5$ $(CAA)_8$ $(GTC)_5$ $(GCT)_5$ และ $(AC)_{10}$ ตามลำดับ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp

จากผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ของเห็ดเผาะ ด้วยไพรเมอร์ไมโครแซเทลไลต์ต่างๆ เลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ $(AC)_{10}$ ไพรเมอร์ $(GTC)_5$ ไพรเมอร์ $AC(CA)_6CYG$ และไพรเมอร์ $(CAA)_8$ นำมาคัดแยกชิ้นส่วนและเพิ่มจำนวนโดยการโคลนและหาลำดับเบสชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์

4.2 ออกแบบไพรเมอร์บริเวณขนาบข้างของไมโครแซเทลไลต์

จากการหาลำดับเบสชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์สามารถคัดแยกตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ซึ่งมีส่วนปลายทั้งสองข้างของชิ้นส่วนเป็นไมโครแซเทลไลต์ได้ทั้งหมด 32 ตำแหน่ง (ภาคผนวก ค) คือ จากไพรเมอร์ $(AC)_{10}$ จำนวน 10 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง AC-01 AC-02 AC-03 AC-04 AC-05 AC-06 AC-07 AC-08 AC-09 และ AC-10 จากไพรเมอร์ $AC(CA)_6CYG$ จำนวน 12 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง CA-01 CA-02 CA-03 CA-04 CA-05 CA-06 CA-07 CA-08 CA-09 CA-10 CA-11 และ CA-12 จากไพรเมอร์ $(GTC)_5$ จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง GTC-01 GTC-02 GTC-03 GTC-04 และ GTC-05 และจากไพรเมอร์ $(CAA)_8$ จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง CAA-01 CAA-02 CAA-03 CAA-04 และ CAA-05

ผลการออกแบบไพรเมอร์ IP_1 จากบริเวณลำดับเบสที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ของแต่ละตำแหน่ง และออกแบบไพรเมอร์ IP_2 ของแต่ละตำแหน่งจากบริเวณลำดับเบสที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ กับไพรเมอร์ IP_1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ IP_1 และไพรเมอร์ IP_2 ที่ออกแบบได้ของแต่ละตำแหน่งรวมทั้งสิ้น 32 ตำแหน่ง แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ IP_1 และไพรเมอร์ IP_2ที่ออกแบบจากชิ้นส่วนไอเอสเอสอาร์ของแต่ละตำแหน่ง

ตำแหน่ง	ไพรเมอร์ IP_1	ไพรเมอร์ IP_2
AC-01	5'-CGAACCTGTGCGACTATGCACCAGAGG-3'	5'-GAACGATGATGCTGAGTGGCG-3'
AC-02	5'-CAGTCCTAATAAACTACCCAGTTCGTC-3'	5'-GTA AAATCGCTGTTGCCTCGC-3'
AC-03	5'-CTCAGACAAGTCCAGTTTGGTGAATAG-3'	5'-CTGCTTTCTATCTCTAAGCTG-3'
AC-04	5'-GAAAAGGAAGCGACCCTGGTTTAGCTC-3'	5'-GCGTTTCAGAGCTTGGGAGAC-3'
AC-05	5'-GATAGGACTTGAGCCTAAAGTTCTTAG-3'	5'-CTTGAATGAGGACTTGGGGTG-3'
AC-06	5'-GGTCGAAATCCATCGATACATAGTAGG-3'	5'-CTTTGATTGCTTCTTCAGGAG-3'
AC-07	5'-GTAGATACCGTAGATACTAACCCTCGC-3'	5'-GTCCCCGACTCCATTTGTCGC-3'
AC-08	5'-CATAATGCACCAGGCAAGTCTTGAAAC-3'	5'-CTCCAGCTTAACCCCTATTTC-3'
AC-09	5'-CATGGTTAGCAAAGCCAGTAGATGTGG-3'	5'-CCCTATGCTGTGATTTTATGC-3'
AC-10	5'-CTGCAGAGATGAGCACAGGAATTGAGG-3'	5'-GGTACCTGAAAGAATGCAAAG-3'
CA-01	5'-CATCTCAGAATAGAAGGATCGGAACAG-3'	5'-CACCAATGGGATAAGGCGTCG-3'
CA-02	5'-CATGCTCTGTTCCTTTCCATACATCTC-3'	5'-GTCATCTCTGTGTGACTCTGG-3'
CA-03	5'-CAACAGAGAAGACAAAATGCTGTGGAG-3'	5'-GTCTTTACATGGACCTAGACC-3'

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ตำแหน่ง	ไพรเมอร์ IP_1	ไพรเมอร์ IP_2
CA-04	5'-GCAATCTCAGTTCACTTCCTGTCCCTC-3'	5'-GCTATTACTACGCCATATACAGG-3'
CA-05	5'-GGGCAAGTAATATGGCTGTGGTAGTAG-3'	5'-GAAGTTCAAGCATTGCCCGAC-3'
CA-06	5'-CTGATTGTCATGCTCTGTTCCTTTCGG-3'	5'-CATCTCTGTCATCTCTGCATG-3'
CA-07	5'-GTGAGATTCTTGATCCATTTGGCGCCC-3'	5'-GTGACTTGTGCGAACAACAGG-3'
CA-08	5'-GGGTCGTGAGATTTTAGAAGTCGTATC-3'	5'-CCGAGTTCCGGGATAGATCGG-3'
CA-09	5'-GTGAACACGTGACGTATGGTAAACATC-3'	5'-CTCGTCTTTACTCTTGCATAG-3'
CA-10	5'-CACGCTACGTTCTGTGCTTCTTTTTGC-3'	5'-GTCTCTTTGTCTCTCGCTTCC-3'
CA-11	5'-CAGTCTTTGTCACACTCTGTTCCTTTC-3'	5'-CATCATCTCTGCATGACTCAG-3'
CA-12	5'-GTCAGGTGTCACAACATCAGAACAGTG-3'	5'-CTTCTCCCCCCGTTTCCGTTG-3'
GTC-01	5'-CAGACTCCCCAGCAAACGAATCAGCAG-3'	5'-GACGGTTTCATCAACGACCAG-3'
GTC-02	5'-GGCACCGTTGGTAGTGAACTTTGAAGC-3'	5'-CTTCAAGGACTGCAAACGTGG-3'
GTC-03	5'-GATTTTGATTTGGACGGCGAATGGACG-3'	5'-CAGGCACTGCAAGAATGGCAG-3'
GTC-04	5'-GGAAAGGGAAGACTGCTGACCGTGATG-3'	5'-GAGTTGGCAGGAGGGAGATGG-3'

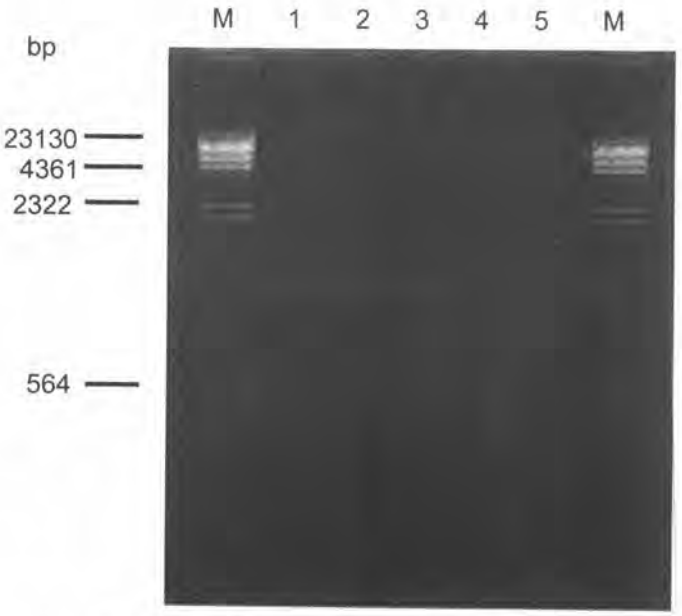
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ตำแหน่ง	ไพรเมอร์ IP_1	ไพรเมอร์ IP_2
GTC-05	5'-GGAAAGGGAAGACTGCTGACCGTGATG-3'	5'-GGAGGGAGATGGCGAAATGAC-3'
CAA-01	5'-CTTAAGTTAGTCTTCCAGCACAGACAG-3'	5'-GACTGCGGTCATTGTAGGACC-3'
CAA-02	5'-GTTGTATTGGCCCTGGCTCATACATGG-3'	5'-CGTTTTCTATCGTATCTCCAC-3'
CAA-03	5'-GATGAGGAGCCAGATTTTCTTGAGGTG-3'	5'-GGTCAGAGACTCAAAAACTTG-3'
CAA-04	5'-CTTCCATACAGTTGCTCATTGCCTGTC-3'	5'-GTTTGACTGGCAAGCATCTAC-3'
CAA-05	5'-CTGCCATGCCATGAAGAAGGCAAATGG-3'	5'-GATATGTCTTTGACCTTACCC-3'

4.3 ออกแบบไพรเมอร์บริเวณขนาบข้างอีกด้านหนึ่งของไมโครแซเทลไลต์

4.3.1 สร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ

จากการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเห็ดเผาะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Ssp* I *Eco* RV *Rsa* I *Alu* I หรือ *Hae* III ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลการตัดจโนมิกดีเอ็นเอดังภาพที่ 4.2 จากภาพปรากฏแถบของดีเอ็นเอเป็นปื้นบาง ๆ ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่อนข้างต่ำ จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 4.2 ผลการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเห็ดเผาะด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่าง ๆ ตรวจสอบผลบนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ช่องที่ 1 - 5 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของเห็ดเผาะที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Ssp* I *Eco* RV *Rsa* I *Alu* I และ *Hae* III ตามลำดับ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA /*Hind* III

4.3.2 ทำ DNA Walking

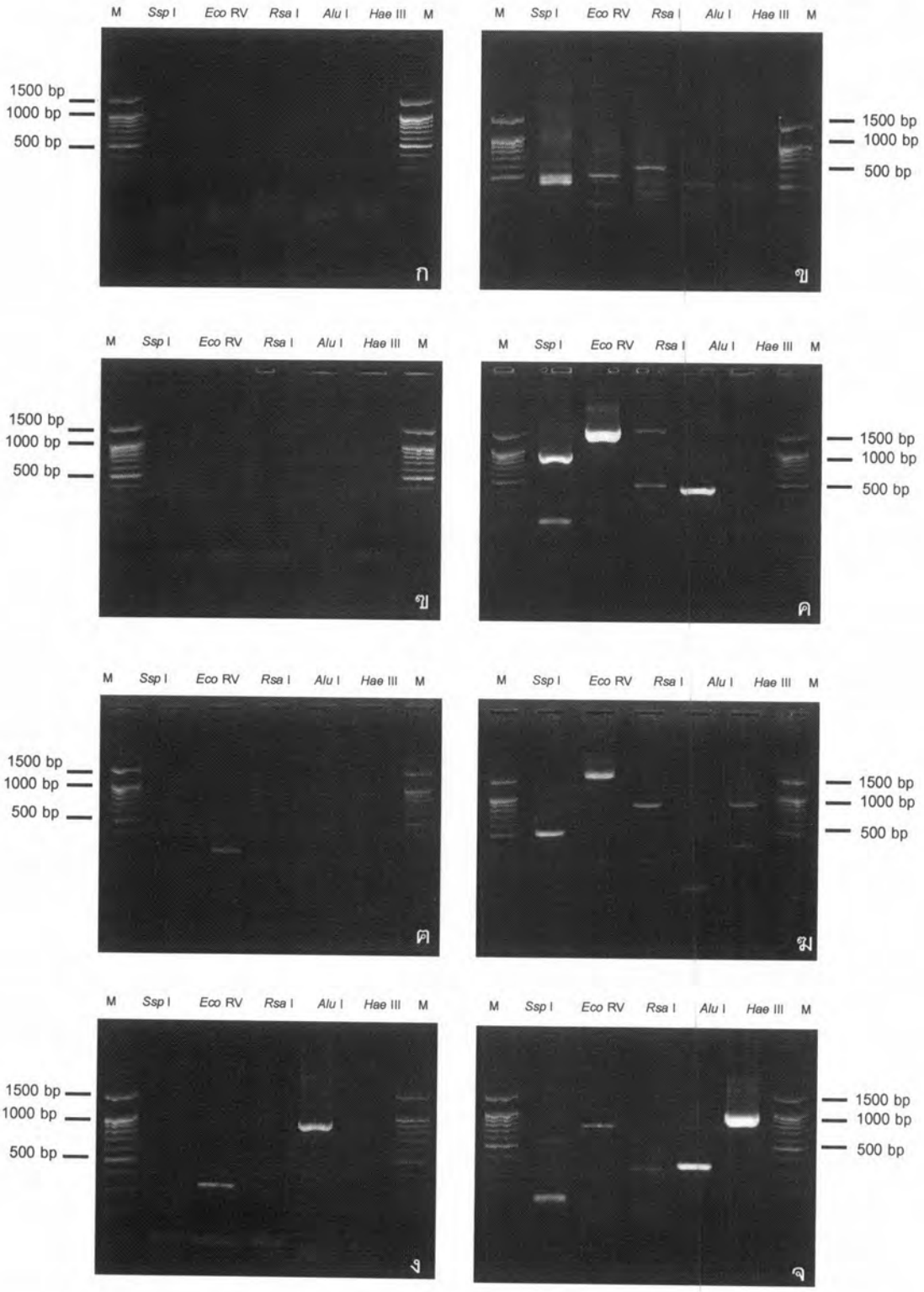
การทำ DNA Walking เพื่อให้ทราบลำดับเบสที่ขนาบข้างอีกด้านหนึ่งของไมโครแซเทลไลต์ โดยทำ Nested PCR ซึ่งพีซีอาร์ขั้นตอนแรกใช้ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากข้อ 4.3.1 เชื่อมด้วย Blunt adaptor เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ IP_1 ของแต่ละตำแหน่งกับไพรเมอร์ AP_1 และการทำพีซีอาร์ขั้นตอนที่ 2 ใช้ผลิตผลพีซีอาร์ขั้นตอนแรกเจือจาง 100 เท่า เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ IP_2 ของแต่ละตำแหน่งกับไพรเมอร์ AP_2 พบว่า จากตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ทั้งหมด 32 ตำแหน่ง ได้ผลิตผลพีซีอาร์ขั้นตอนที่ 2 ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปรากฏแถบดีเอ็น

มีทั้งหมด 25 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง CA-02 CA-04 CA-05 CA-06 CA-07 CA-08 CA-09 CA-11 CA-12 AC-01 AC-02 AC-03 AC-04 AC-06 AC-07 GTC-01 GTC-02 GTC-03 GTC-04 GTC-05 CAA-01 CAA-02 CAA-03 CAA-04 และ CAA-05 โดยตำแหน่ง CA-02 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III ตำแหน่ง CA-04 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I ตำแหน่ง CA-05 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RV ตำแหน่ง CA-06 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I *Eco* RV และ *Alu* I ตำแหน่ง CA-07 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RV และ *Alu* I ตำแหน่ง CA-08 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RV *Rsa* I *Alu* I และ *Hae* III ตำแหน่ง CA-09 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RV *Rsa* I และ *Hae* IIIตำแหน่ง CA-11 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I และ *Alu* I ตำแหน่ง CA-12 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I ตำแหน่ง AC-01 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RV *Rsa* I และ *Alu* I ตำแหน่ง AC-02 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I และ *Eco* RV ตำแหน่ง AC-03 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I ตำแหน่ง AC-04 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I *Eco* RV และ *Hae* III ตำแหน่ง AC-06 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa* I และ *Alu* I ตำแหน่ง AC-07 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RV *Rsa* I และ *Hae* III ตำแหน่ง GTC-01 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I และ *Eco* RV ตำแหน่ง GTC-02 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa* I และ *Hae* III ตำแหน่ง GTC-03 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I ตำแหน่ง GTC-04 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I และ *Eco* RV ตำแหน่ง GTC-05 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I *Eco* RV *Alu* I และ *Hae* III ตำแหน่ง CAA-01 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RV และ *Rsa* I ตำแหน่ง CAA-02 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I และ *Eco* RV ตำแหน่ง CAA-03 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I และ *Alu* I ตำแหน่ง CAA-04 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I และ *Alu* I ตำแหน่ง CAA-05 ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RV และ *Rsa* I

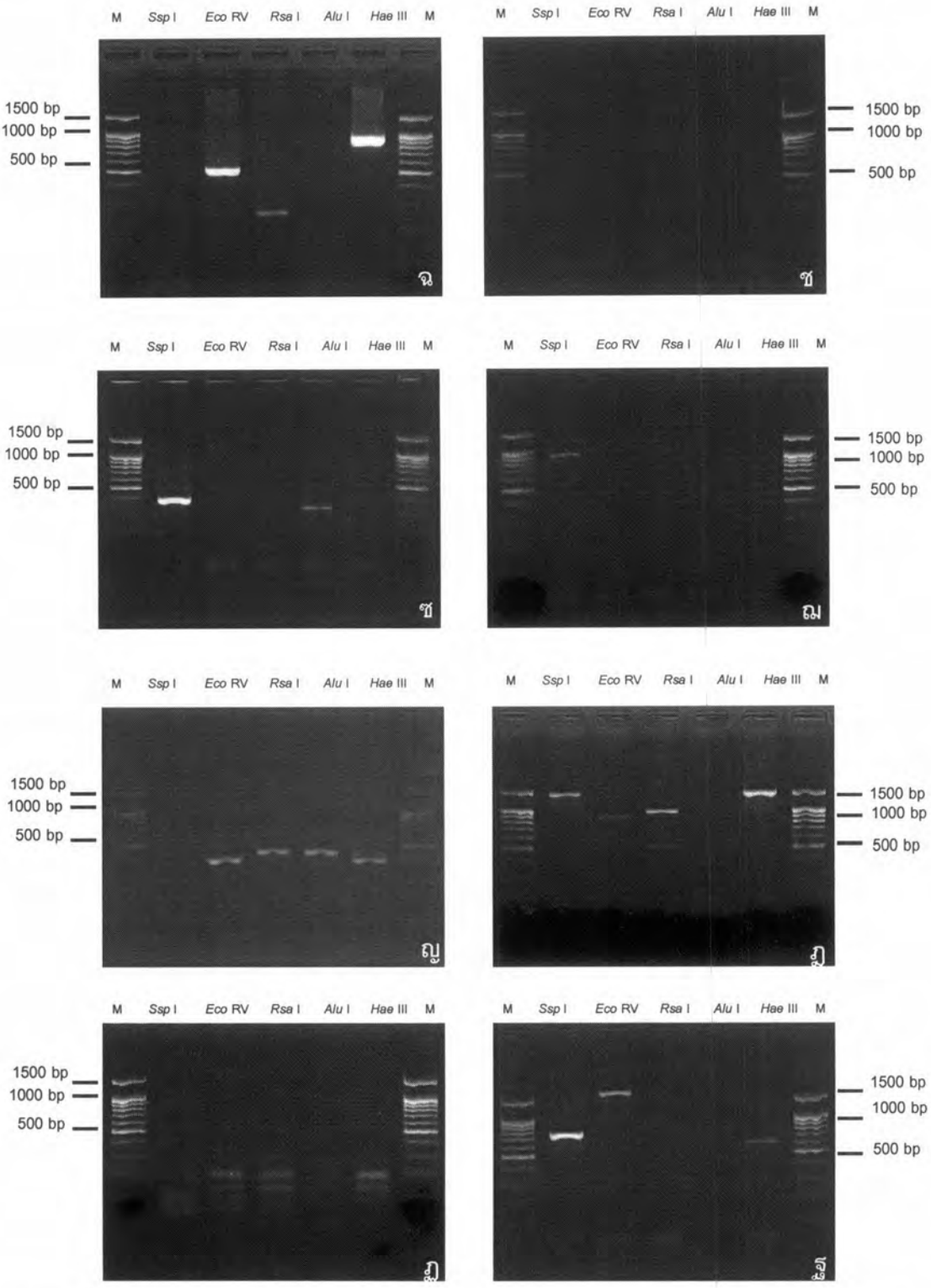
ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ มีทั้งหมด 3 ตำแหน่ง ได้แก่ CA-01 CA-03 และ CA-10 ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้หลายชิ้นส่วนโดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในทุกห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 5 ชนิด มีทั้งหมด 4 ตำแหน่ง ได้แก่ AC-05 AC-08 AC-09 และ AC-10 (ภาพที่ 4.3)

และเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวในห้องสมุดดีเอ็นเอต่าง ๆ มาหาลำดับเบสชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่คาดว่าจะมีตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์โดย ตำแหน่ง CA-02 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III ตำแหน่ง CA-04 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I ตำแหน่ง CA-05 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RV ตำแหน่ง CA-06 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I ตำแหน่ง CA-07 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RV ตำแหน่ง CA-08 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I ตำแหน่ง CA-09 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RV ตำแหน่ง CA-11 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I ตำแหน่ง CA-12 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I ตำแหน่ง AC-01 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa* I ตำแหน่ง AC-02 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RV ตำแหน่ง AC-04 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III ตำแหน่ง AC-06 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa* I ตำแหน่ง AC-07 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa* I ตำแหน่ง GTC-01 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I ตำแหน่ง GTC-02 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae* III ตำแหน่ง GTC-03 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I ตำแหน่ง GTC-04 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I ตำแหน่ง GTC-05 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I ตำแหน่ง CAA-01 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco* RV ตำแหน่ง CAA-02 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I ตำแหน่ง CAA-03 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I ตำแหน่ง CAA-04 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Ssp* I ตำแหน่ง CAA-05 เลือกแถบดีเอ็นเอในห้องสมุดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa* I

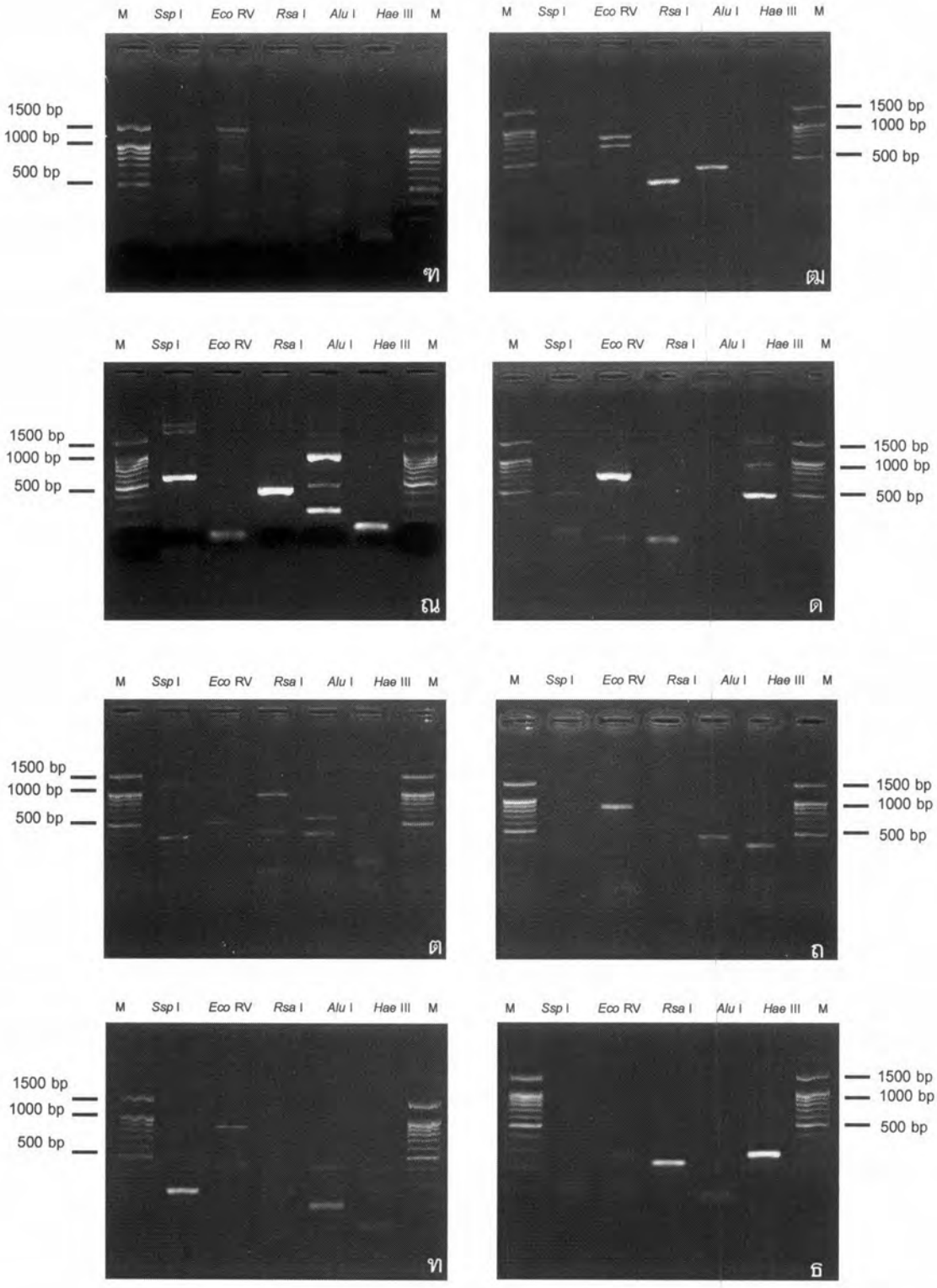
จากการเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวทั้งหมด 25 ตำแหน่ง มี 3 ตำแหน่งที่อาจจะไม่มีตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดยาวหรือสั้นเกินไป ได้แก่ AC-02 AC-03 และ CA-12



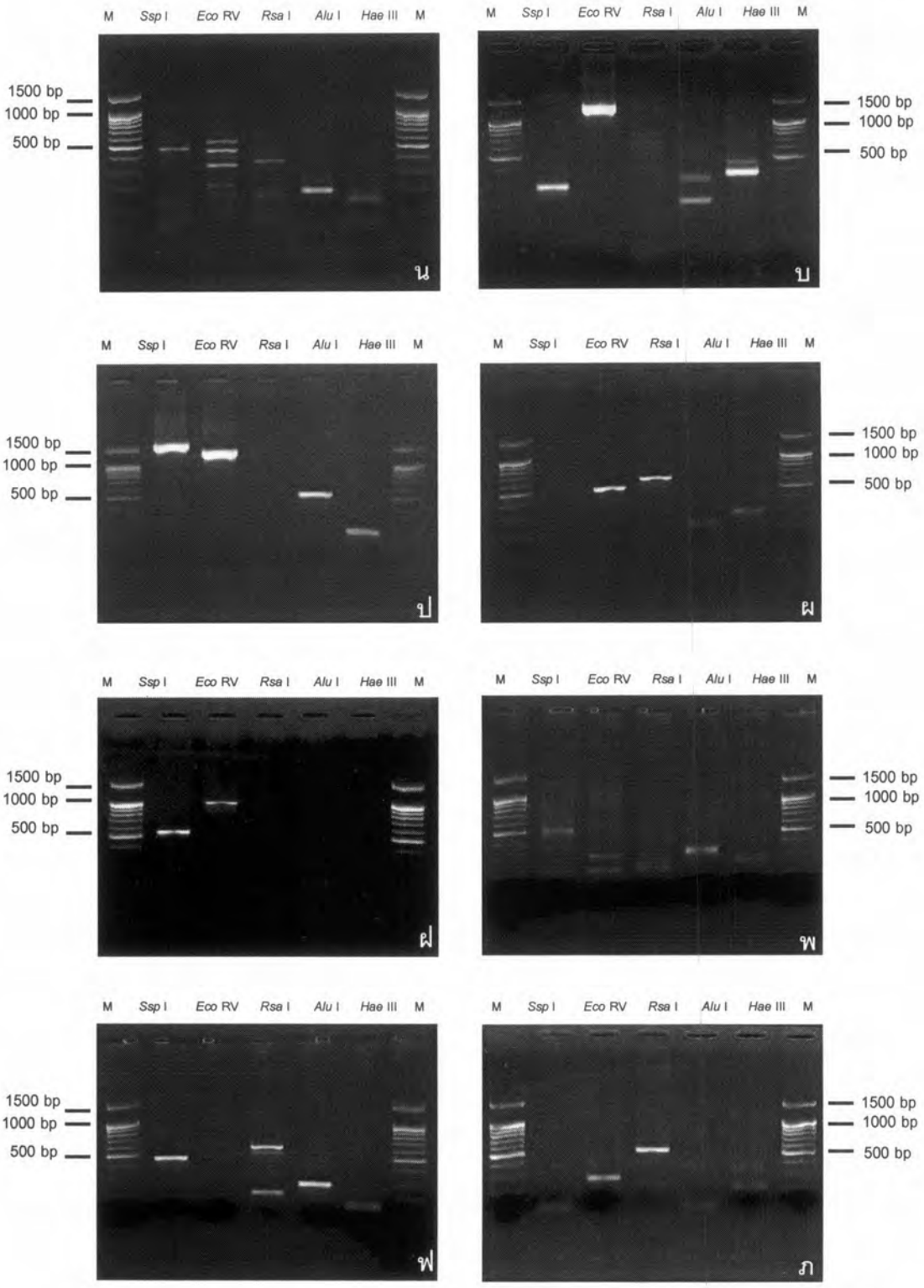
ภาพที่ 4.3 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขั้นตอนที่ 2 จากผลิตผลพีซีอาร์ขั้นตอนแรกด้วยไพรเมอร์ AP_2 และ IP_2 ของแต่ละตำแหน่ง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp; ก: CA-01 ข: CA-02 ฃ: CA-03 ค: CA-04 ฅ: CA-05 ฆ: CA-06 ง: CA-07 และ จ: CA-08



ภาพที่ 4.3 (ต่อ) ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขั้นตอนที่ 2 จากผลิตผลพีซีอาร์ขั้นตอนแรกด้วยไพรเมอร์ AP_2 และ IP_2 ของแต่ละตำแหน่ง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp; ฉ: CA-09 ช: CA-10 ซ: CA-11 ฌ: CA-12 ญ: AC-01 ฎ: AC-02 ฏ: AC-03 และ ฐ: AC-04



ภาพที่ 4.3 (ต่อ) ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขั้นตอนที่ 2 จากผลิตผลพีซีอาร์ขั้นตอนแรกด้วยไพรเมอร์ AP_2 และ IP_2 ของแต่ละตำแหน่ง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp; ฑ: AC-05 ฒ: AC-06 ณ: AC-07 ด: AC-08 ต: AC-09 ถ: AC-10 ท: GTC-01 และ ธ: GTC-02



ภาพที่ 4.3 (ต่อ) ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขั้นตอนที่ 2 จากผลิตผลพีซีอาร์ขั้นตอนแรกด้วยไพรเมอร์ AP_2 และ IP_2 ของแต่ละตำแหน่ง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp; น: GTC-03 บ: GTC-04 ป: GTC-05 ผ: CAA-01 ฝ: CAA-02 พ: CAA-03 ฟ: CAA-04 และ ภ: CAA-05

จากการหาลำดับเบสชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่คาดว่าจะมีตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว 22 ตำแหน่ง พบว่า มี 12 ตำแหน่งที่มีตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์และสามารถออกแบบไพรเมอร์ IP_3 ได้ ได้แก่ ตำแหน่ง CA-02 CA-04 CA-05 CA-06 CA-09 AC-01 GTC-01 GTC-04 GTC-05 CAA-01 CAA-02 และ CAA-04 (ภาคผนวก ค) และมีทั้งหมด 10 ตำแหน่งที่ไม่พบตำแหน่งของไมโครแซเทลไลต์ ได้แก่ CA-07 CA-08 CA-11 AC-04 AC-06 AC-07 GTC-02 GTC-03 CAA-03 และ CAA-05 ลำดับเบสของไพรเมอร์ IP_3 ของแต่ละตำแหน่งแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลำดับเบสของไพรเมอร์ IP_3 ที่ออกแบบในแต่ละตำแหน่ง

ตำแหน่ง	ไพรเมอร์ IP_3
CA-02	5'-GCATCTGAAGGACATAAGCAG-3'
CA-04	5'-CTCCTCTCCAACGTATTTATC-3'
CA-05	5'-GCAGGTCACATTGCGATGACG-3'
CA-06	5'-GAGATGGAAAGAACAGAGAGG-3'
CA-09	5'-GTCATTCGACATTCCCTCACG -3'
AC-01	5'-GCTGGGGTTTTAACAATTGTG-3'
GTC-01	5'-CGAAAACGCCAAAAAGCAAAG-3'
GTC-04	5'-CAACTCCTCCCTTTTCTACCG-3'
GTC-05	5'-CTGGACGGTCAAGATATACTC-3'
CAA-01	5'-GTACCATCTGGCACATGTTAG-3'
CAA-02	5'-CCAATGCAAGACATAGTGCTC-3'
CAA-04	5'-CTTCGGAGTCACATGGAAGAG-3'

4.4 คัดเลือกไพรเมอร์และตรวจสอบการมีโพลีมอร์ฟิซึม

4.4.1 คัดเลือกไพรเมอร์

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดจากชิ้นส่วนตัวอย่างดอกเห็ดเผาะแห้งที่เก็บรวบรวมจากป่าเต็งรังแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดน่าน จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดตาก และจังหวัดชัยภูมิ มาเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงบริเวณไมโครแซเทลไลต์โดยใช้ไพรเมอร์ IP_1 กับไพรเมอร์ IP_3 หรือไพรเมอร์ IP_2 กับไพรเมอร์ IP_3 ที่ออกแบบ (ตารางที่ 4.3) พบว่าไพรเมอร์ในตำแหน่ง CA-02 CA-04 CA-05 CA-06 CA-09 GTC-01 GTC-04 GTC-05 CAA-01 CAA-02 และ CAA-04 สามารถเพิ่มจำนวนไมโครแซเทลไลต์ในเห็ดเผาะจากแหล่งต่าง ๆ ได้ ส่วนไพรเมอร์ในตำแหน่ง AC-01 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนไมโครแซเทลไลต์ในเห็ดเผาะจากแหล่งต่าง ๆ ได้

ตารางที่ 4.3 ชุดซ้ำของไมโครแซเทลไลต์ ลำดับเบสของไพรเมอร์ และอุณหภูมิในการเข้าจับสายดีเอ็นเอ (T_m) ของไพรเมอร์ในแต่ละตำแหน่ง

ตำแหน่ง	ชุดซ้ำของไมโครแซเทลไลต์	ลำดับเบสของไพรเมอร์ 5'-3'	T_m (องศาเซลเซียส)
CA-02	$(AC)_6$	5'-CATGCTCTGTTCCTTTCCATACATCTC-3'	62.5
		5'-GCATCTGAAGGACATAAGCAG-3'	
CA-04	$C_5AATG(CA)_3$	5'-GCTATTACTACGCCATATACAGG-3'	59.0
		5'-CTCCTCTCCAACGTATTTATC-3'	
CA-05	$(AC)_3$	5'-GGGCAAGTAATATGGCTGTGGTAGTAG-3'	64.0
		5'-GCAGGTCACATTGCGATGACG-3'	
CA-06	$(GA)_3...(GA)_3...(CA)_3$	5'-CATCTCTGTCATCTCTGCATG-3'	60.5
		5'-GAGATGGAAAGAACAGAGAGG-3'	
CA-09	$C_5 (AC)_3$	5'-CTCGTCTTTACTCTTGCATAG -3'	61.0
		5'-GTCATTCGACATTCCCTCACG-3'	
AC-01	$(CT)_2TC(CTC)_3 GTC(CT)_2$	5'-GAACGATGATGCTGAGTGGCG-3'	61.5
		5'-GCTGGGGTTTTAACAATTGTG-3'	
GTC-01	$(CTC)_3 (GTC)_4$	5'-GACGGTTTCATCAACGACCAG-3'	60.5
		5'-CGAAAACGCCAAAAAGCAAAG-3'	

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ตำแหน่ง	ชุดซ้ำของไมโครแซเทลไลต์	ลำดับเบสของไพรเมอร์ 5'-3'	T_m (องศาเซลเซียส)
GTC-04	$(GTC)_5$	5'-GAGTTGGCAGGAGGGAGATGG -3'	63.0
		5'-CAACTCCTCCCTTTTCTACCG -3'	
GTC-05	$(GTC)_5$	5'-GGAGGGAGATGGCGAAATGAC-3'	62.5
		5'-CTGGACGGTCAAGATATACTC-3'	
CAA-01	$(GTTGGT)_4$	5'-GACTGCGGTCATTGTAGGACC-3'	62.5
		5'-GTACCATCTGGCACATGTTAG-3'	
CAA-02	$(AAC)_3$	5'-CGTTTTCTATCGTATCTCCAC-3'	59.0
		5'-CCAATGCAAGACATAGTGCTC-3'	
CAA-04	$(CATTGTCAT)_2...(CAT)_3$	5'-GTTTGACTGGCAAGCATCTAC-3'	61.0
		5'-CTTCGGAGTCACATGGAAGAG-3'	

4.4.2 ตรวจสอบการมีโพลีมอร์ฟิซึม

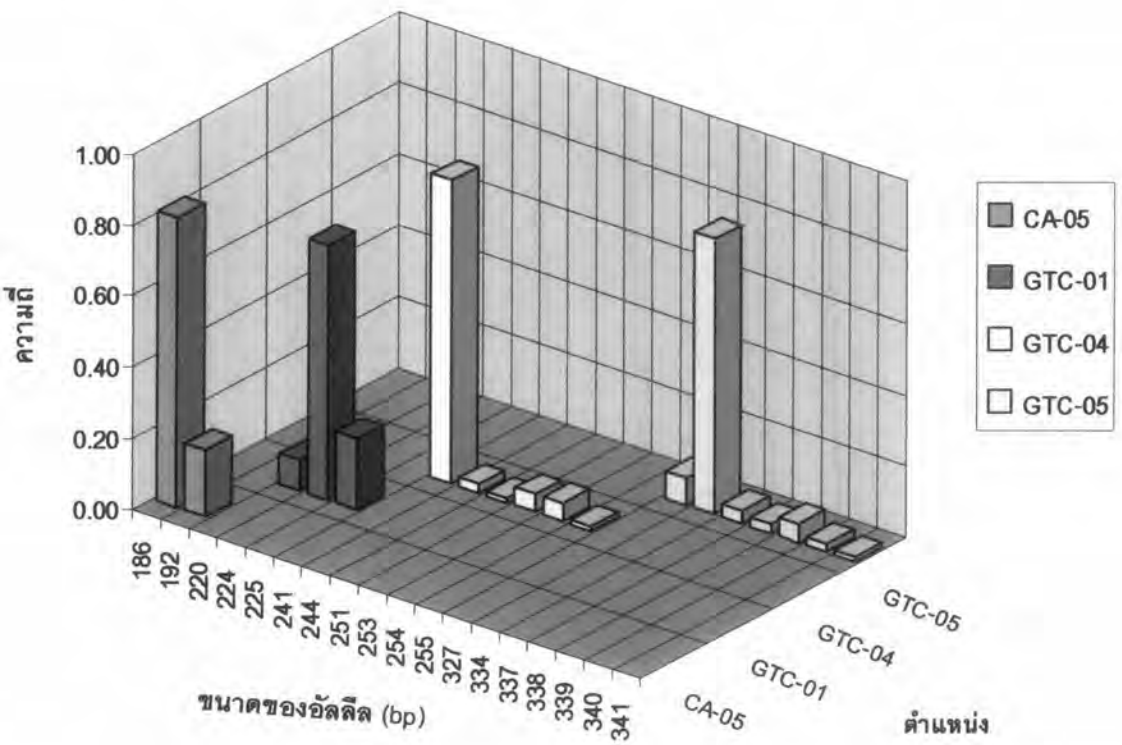
ตรวจสอบการมีโพลีมอร์ฟิซึมของเห็ดเผาะที่เก็บรวบรวมจากป่าเต็งรังแหล่งต่าง ๆ โดยใช้ผลิตผลพีซีอาร์ที่เพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากชิ้นส่วนตัวอย่างเห็ดเผาะแห้งที่เก็บรวบรวมจากป่าเต็งรังแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยจำนวน 4 ประชากร รวมทั้งหมด 40 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ โดยคัดเลือกผลิตผลพีซีอาร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบน sequencing gel 6 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเครื่อง SQ-5500 sequence (Hitachi) พบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 4 ตำแหน่งมีโพลีมอร์ฟิซึม ได้แก่ ตำแหน่ง CA-05 GTC-01 GTC-04 และ GTC-05 (ภาคผนวก ค) โดยในตำแหน่ง GTC-05 สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ของดีเอ็นเอที่สกัดจากชิ้นส่วนตัวอย่างเห็ดเผาะได้ 39 ตัวอย่างจากทั้งหมด 40 ตัวอย่าง ส่วนเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ไม่มีความแตกต่างของอัลลีล โดย 5 ตำแหน่งให้ผลเป็นโมโนมอร์ฟิก (monomorphic) ได้แก่ ตำแหน่ง CA-04 CA-09 CAA-01 CAA-02 และ CAA-04 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ที่ให้ผลเป็นโมโนมอร์ฟิกแสดงดังตารางที่ 4.4 และ 2 ตำแหน่งให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ ได้แก่ ตำแหน่ง CA-02 และ CA-06

ตารางที่ 4.4 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ที่ให้ผลเป็นโมโนมอร์ฟิก

ตำแหน่ง	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (bp)
CA-04	151
CA-09	198
CAA-01	320
CAA-02	340
CAA-04	269

4.5 ศึกษาลักษณะเฉพาะของตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ของเครื่องหมายไมโครแซเทล-ไลต์ที่พัฒนาขึ้น

จากข้อมูลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่บริเวณไมโครแซเทลไลต์ของไพรเมอร์ แต่ละคู่ที่ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบน sequencing gel 6 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์รูปแบบอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย Fraglys version 3 (Hitachi) พบว่าในตำแหน่ง CA-05 GTC-01 GTC-04 และ GTC-05 มีจำนวนอัลลีล 2 3 6 และ 7 อัลลีลต่อตำแหน่ง ตามลำดับ ความถี่อัลลีลของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ทั้ง 4 ตำแหน่ง แสดงดังภาพที่ 4.4 คำนวณค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คาดหมายและค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คำนวณได้โดยใช้โปรแกรม Cervus version 2.0 (Marshall และคณะ, 1998) พบว่าค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คาดหมายมีค่า 0.309 0.450 0.275 และ 0.402 ตามลำดับ ค่าเฮเทโร-ไซโกซิตีที่คำนวณได้มีค่า 0.025 0.175 0.100 และ 0.103 ตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบความเบี่ยงเบนจาก Hardy-Weinberg equilibrium โดยใช้โปรแกรม Genpop version 3.4 พบว่าเครื่องหมายไมโครแซเทลไลทั้ง 4 ตำแหน่งมีความแตกต่างจาก Hardy-Weinberg equilibrium อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 4.5) และเมื่อหาค่า linkage disequilibrium พบว่ามีความแตกต่างระหว่างเครื่องหมายไมโครแซเทลไลทั้ง 4 ตำแหน่ง ($P < 0.01$)



ภาพที่ 4.4 ความถี่อัลลีลของตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ CA-05 GTC-01 GTC-04 และ GTC-05

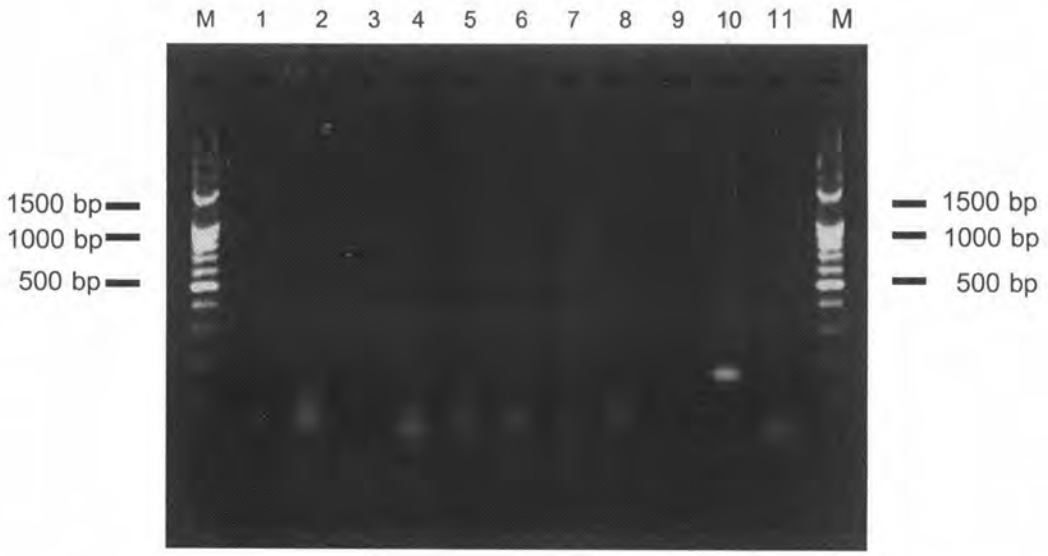
ตารางที่ 4.5 ลักษณะเฉพาะของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้นจากเห็ดเผาะ

ตำแหน่ง	ชุดซ้ำของไมโครแซเทลไลต์	ลำดับเบสของไพรเมอร์ 5'-3'	T_a (องศาเซลเซียส)	ขนาด (bp)	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนอัลลีล	H_o	H_e
CA-05*	$(AC)_3$	5'-GGGCAAGTAATATGGCTGTGGTAGTAG-3'	54	186-192	40	2	0.025	0.309
		5'-GCAGGTCACATTGCGATGACG-3'						
GTC-01*	$(CTC)_3(GTC)_4$	5'-GACGGTTTCATCAACGACCAG-3'	54	220-225	40	3	0.175	0.450
		5'-CGAAAACGCCA/ AAAGCAAAG-3'						
GTC-04*	$(GTC)_5$	5'-GACGGTTTCATCAACGACCAG-3'	54	241-255	40	6	0.100	0.275
		5'-CGAAAACGCCAAAAAGCAAAG-3'						
GTC-05*	$(GTC)_5$	5'-GGAGGGAGATGGCGAAATGAC-3'	54	327-341	39	7	0.103	0.402
		5'-CTGGACGGTCAAGATATACTC-3'						

T_a คือ อุณหภูมิในการเข้าจับสายดีเอ็นเอของไพรเมอร์ H_o คือ ค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คำนวณได้ H_e คือ ค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คาดหมาย * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.01$)

4.6 ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ *R. viscica S. sinnamariense L. deliciosus L. piperatus Amanita* sp. *Lactarius* sp. 1 *Lactarius* sp. 2 *Lactarius* sp. 3 และ *P. abditus* โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาจากเห็ดเผาะ (ภาพที่ 4.5 - 4.11) พบว่าเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในตำแหน่ง CA-05 และ GTC-05 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ในเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาทั้ง 9 ชนิดได้ เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในตำแหน่ง GTC-01 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ในเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่นได้ ยกเว้น *L. deliciosus L. piperatus Amanita* sp. *Lactarius* sp. 1 และ *Lactarius* sp. 3 เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในตำแหน่ง GTC-04 ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ในเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่นได้ ยกเว้น *Amanita* sp. และ *Lactarius* sp. 1 ดังสรุปในตารางที่ 4.6



ภาพที่ 4.5 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ IP_1 และ IP_3 ของตำแหน่ง CA-05 ตรวจสอบผลบนอะกาโรส-เจล 1.5 เปอร์เซ็นต์

ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp

ช่องที่ 1 คือ *Russula viscica*

ช่องที่ 2 คือ *Scleroderma sinnamariense*

ช่องที่ 3 คือ *Lactarius deliciosus*

ช่องที่ 4 คือ *Lactarius piperatus*

ช่องที่ 5 คือ *Amanita* sp.

ช่องที่ 6 คือ *Lactarius* sp. 1

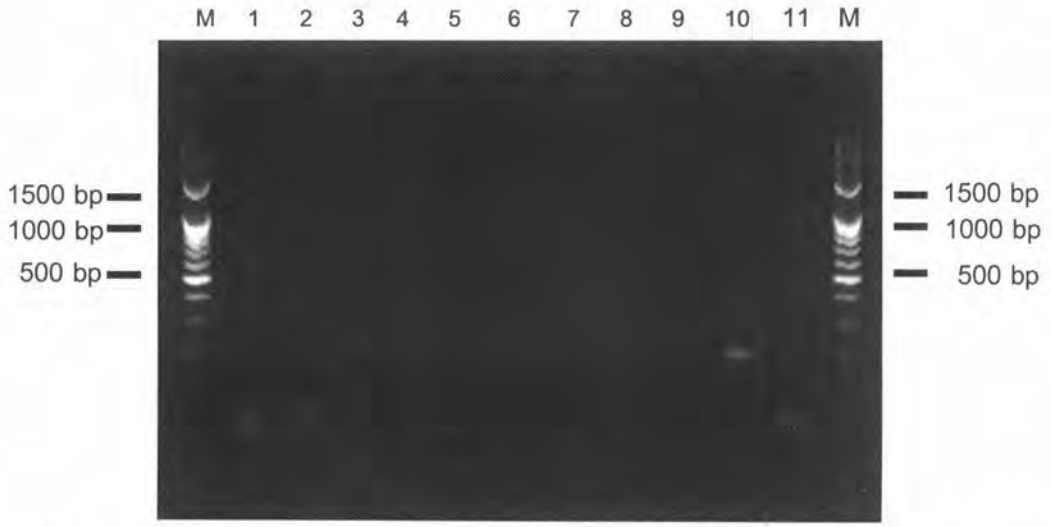
ช่องที่ 7 คือ *Lactarius* sp. 2

ช่องที่ 8 คือ *Lactarius* sp. 3

ช่องที่ 9 คือ *Pisolithus abditus*

ช่องที่ 10 คือ *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan

ช่องที่ 11 คือ ชุดควมคุมไม่ใส่ดีเอ็นเอ



ภาพที่ 4.6 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ IP_2 และ IP_3 ของตำแหน่ง GTC-01 ตรวจสอบผลบนอะกาโรส-เจล 1.5 เปอร์เซ็นต์

ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp

ช่องที่ 1 คือ *Russula viscica*

ช่องที่ 2 คือ *Scleroderma sinnamariense*

ช่องที่ 3 คือ *Lactarius deliciosus*

ช่องที่ 4 คือ *Lactarius piperatus*

ช่องที่ 5 คือ *Amanita* sp.

ช่องที่ 6 คือ *Lactarius* sp. 1

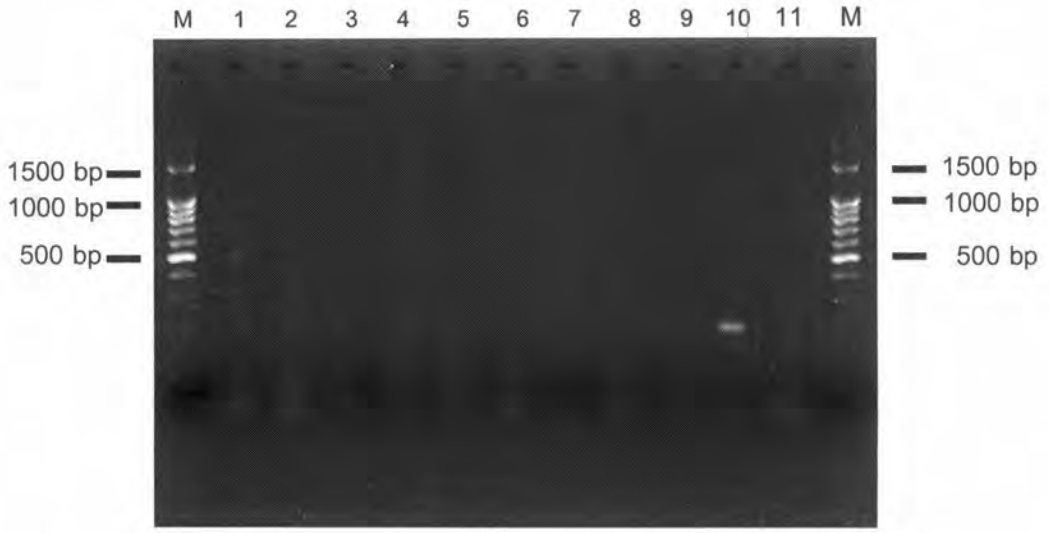
ช่องที่ 7 คือ *Lactarius* sp. 2

ช่องที่ 8 คือ *Lactarius* sp. 3

ช่องที่ 9 คือ *Pisolithus abditus*

ช่องที่ 10 คือ *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan

ช่องที่ 11 คือ ชุดควมคุมไม่ใส่ดีเอ็นเอ



ภาพที่ 4.7 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ IP_2 และ IP_3 ของตำแหน่ง GTC-04 ตรวจสอบผลบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์

ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp

ช่องที่ 1 คือ *Russula viscica*

ช่องที่ 2 คือ *Scleroderma sinnamariense*

ช่องที่ 3 คือ *Lactarius deliciosus*

ช่องที่ 4 คือ *Lactarius piperatus*

ช่องที่ 5 คือ *Amanita* sp.

ช่องที่ 6 คือ *Lactarius* sp. 1

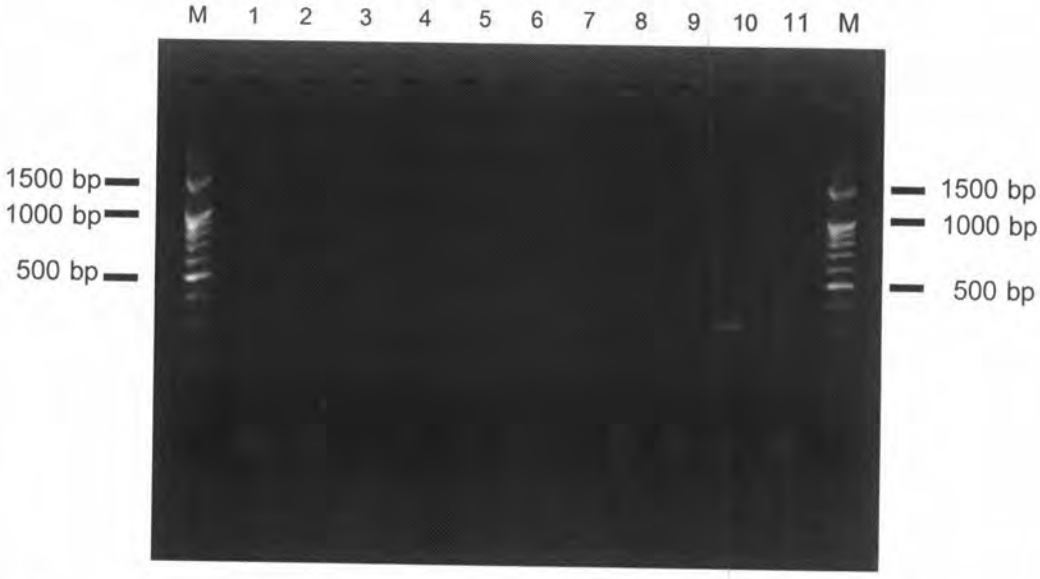
ช่องที่ 7 คือ *Lactarius* sp. 2

ช่องที่ 8 คือ *Lactarius* sp. 3

ช่องที่ 9 คือ *Pisolithus abditus*

ช่องที่ 10 คือ *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan

ช่องที่ 11 คือ ชุดควบคุมไม่ใส่ดีเอ็นเอ



ภาพที่ 4.8 ผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ IP_2 และ IP_3 ของตำแหน่ง GTC-05 ตรวจสอบผลบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์

ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp

ช่องที่ 1 คือ *Russula viscica*

ช่องที่ 2 คือ *Scleroderma sinnamariense*

ช่องที่ 3 คือ *Lactarius deliciosus*

ช่องที่ 4 คือ *Lactarius piperatus*

ช่องที่ 5 คือ *Amanita* sp.

ช่องที่ 6 คือ *Lactarius* sp. 1

ช่องที่ 7 คือ *Lactarius* sp. 2

ช่องที่ 8 คือ *Lactarius* sp. 3

ช่องที่ 9 คือ *Pisolithus abditus*

ช่องที่ 10 คือ *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan

ช่องที่ 11 คือ ชุดควมคุมไม่ใส่ดีเอ็นเอ

ตารางที่ 4.6 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนไมโครแซเทลไลต์ในตำแหน่งต่าง ๆ จากเห็ดเอคโตไมคอร์-ไรซาชนิดอื่น ๆ โดยไพรเมอร์ที่พัฒนาจากเห็ดเผาะ

เห็ดเอคโตไมคอร์ไรซา	ตำแหน่ง			
	CA-05	GTC-01	GTC-04	GTC-05
Russula viscica	-	-	+	-
Scleroderma sinnamariense	-	-	-	-
Lactarius deliciosus	-	+	-	-
Lactarius piperatus	-	+	-	-
Amanita sp.	-	+	+	-
Lactarius sp. 1	-	+	+	-
Lactarius sp. 2	-	-	-	-
Lactarius sp. 3	-	+	-	-
Pisolithus abditus	-	-	-	-

- คือ ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนไมโครแซเทลไลต์ได้

+ คือ สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนไมโครแซเทลไลต์ได้