

**ภาคผนวก**

## ภาคผนวก

### อุปกรณ์และสารเคมี

#### 1. อุปกรณ์และสารเคมีในการสกัด วัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

1.1 ไนโตรเจนเหลว

1.2 Ethanol  $C_2H_5OH$  (Merck, Germany)

1.3 Chloroform  $CHCl_3$  (Merck, Germany)

1.4 Isoamyl alcohol  $CH_3COOH$  (Merck, Germany)

1.5 CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide; Sigma, USA.)

1.6 Tris base (Sigma, USA)

1.7 Sodium chloride (NaCl; Merck, Germany)

1.8 EDTA  $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$  (Ethylenediamine tetraacetate acid; Sigma, USA.)

1.9 2-Mercaptoethanol (Bio basic Inc.)

1.10 PVP (Polyvinyl pyrrolidone; Sigma, USA)

1.11 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ml)

1.12 ชุดแยกขนาดดีเอ็นเอ (gel electrophoresis)

- 1.13 1xTAE buffer (40 mM Tris HCl pH 8.0, 20 mM Acetate , 1 mM EDTA pH 8.0)
  - 1.14 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Sigma รุ่น 2K15; USA)
  - 1.15 ชุดฉายแสงยูวีและถ่ายภาพดีเอ็นเอ (DNA photodocumentation)
  - 1.16 ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (Biolab, England)
  - 1.17 6X loading dye (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol)
  - 1.18 ผง agarose (Genemate, Spain)
  - 1.19 Propanol C<sub>3</sub>H<sub>12</sub>O (Merck, Germany)
  - 1.20 1XTE (10 mM Tris—HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)
  - 1.21 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath incubator; Taiyo, Japan)
2. อุปกรณ์และสารเคมีในการวิเคราะห์โดยเทคนิคเอฟแอลพี
- 2.1 *Eco*RI kit (Biola , England)
  - 2.2 *Mse*I kit (Biola , England)
  - 2.3 T4 DNA ligase kit (Biolab, England)
  - 2.4 *Eco*RI adapter (KU vector, Thailand)
  - 2.5 *Mse*I adpter (KU vector, Thailand)

- 2.6 *EcoRI* primer +1 (KU vector, Thailand)
  - 2.7 *EcoRI* primer +3(KU vector, Thailand)
  - 2.8 *MseI* primer +1(KU vector, Thailand)
  - 2.9 *MseI* primer +3 (KU vector, Thailand)
  - 2.10 dNTP kit (dATP, dCTP, dTTP, dGTP; Fermentus, USA)
  - 2.11 เครื่องบ่มและเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย (Biometa รุ่น T-Gradient, Germany)
  - 2.12 ชุด *Taq* DNA polymerase (250 Unit; Qiagen, Germany)
3. สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส
    - 3.1 5X TBE buffer (Tris base 54 กรัม Boric acid 27.5 กรัมและ EDTA pH 8.0 20 ml)
    - 3.2 สารละลายโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 19 ต่อ 1 (ประกอบด้วย acrylamide 28.5 กรัม และ bis-methyl acrylamide 1.5 กรัม)
    - 3.3 ชุด *Taq* DNA polymerase (250 Unit; Qiagen, Germany)
    - 3.4 เครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย (Biometa รุ่น T-Gradient, Germany)
    - 3.5 2X loading dye (25 mM EDTA pH 8.0 และ Deionized formamide/bromophenol blue)
    - 3.6 Ammonium persulfate (APS; Merck, Germany)

3.7 Bind silane (Pharmacia, USA)

3.8 Ethidium bromide (Sigma, USA)

3.9 N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED; Pharmacia, USA)

3.10 ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 bp (Invitrogen, Brazil)

3.11 เครื่อง Real time DNA fragment analysis (Corbett research รุ่น Gelscan 3000; Australia)

#### 4. โปรแกรมในการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 โปรแกรม TFPGA (Miller, 1997) สำหรับวิเคราะห์ข้อมูลจากผลการวิเคราะห์เอเฟลแอลพี ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่

4.2 โปรแกรม Bioedit สำหรับตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ก่อนนำไปวิเคราะห์ผลโดยโปรแกรม ClustalW

4.3 โปรแกรม ClustalW สำหรับวิเคราะห์ผลความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆที่มีการกระจายพันธุ์อยู่ในประเทศไทย

#### สูตรอาหาร และสารเคมีสำหรับการทำโคลนนิ่ง

LB (Luria-Bertani Medium) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Bacto-tryptone      | 10 กรัม |
| Bacto yeast extract | 5 กรัม  |
| NaCl                | 10 กรัม |

ปรับ pH 7.5 ด้วย 5 M NaOH  
เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร แล้ว autoclave

#### LA (LBA) medium

|      |                 |
|------|-----------------|
| LB   | 1,000 มิลลิลิตร |
| Agar | 15 กรัม         |

#### 2% X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D galactoside)

ละลาย X-gal 20 มิลลิกรัม ใน dimethylformamide  
ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร  
เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (ไม่ควรเก็บนานเกิน 1 เดือน)

#### 2% IPTG (Isopropyl-b-D Thiogalactopyranoside)

ละลายให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ หรือ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

#### แอมพิซิลิน

ละลายแอมพิซิลิน 0.1 กรัม ในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร  
เก็บไว้เป็น stock ที่อุณหภูมิ -20 °C

#### LB+ แอมพิซิลิน+X-gal+IPTG agar plate

- หลอมอาหาร LB ที่ปราศจากเชื้อ
- เติมแอมพิซิลินจาก stock ที่เข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอัตราส่วน  
แอมพิซิลิน 1 ไมโครลิตร ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร
- เทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อ จานละประมาณ 15-20 มิลลิลิตร
- เมื่ออาหารแข็งแล้วเติมสารดังนี้
 

|          |              |
|----------|--------------|
| 2% X-gal | 40 ไมโครลิตร |
| 2% IPTG  | 10 ไมโครลิตร |
- ใช้แท่งแก้ว spread สารให้ทั่วผิวหน้าอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ

## ภาพผนวก



**ภาพผนวกที่ 1** ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paph. concolor*)

**หมายเหตุ** กล้วยไม้รองเท้านารีในภาพผนวกที่ (1) (2) และ (3) มีลักษณะทาง  
สัณฐานวิทยาแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ซึ่งไม่ได้กล่าวถึงที่นี่

*Paph. concolor* P หมายถึงต้นที่พบบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ  
เรียกว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน



**ภาพผนวกที่ 2** ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดร (*Paph. concolor*)

**หมายเหตุ** *Paph. concolor* A หมายถึงต้นที่พบบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ  
เรียกว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดร



ภาพผนวกที่ 3 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (*Paph. concolor*)  
หมายเหตุ *Paph. concolor* K หมายถึงต้นที่พบบริเวณภาคตะวันตกเรียกว่า  
 กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์



ภาพผนวกที่ 4 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรัง (*Paph. godefroyae*)



ภาพผนวกที่ 5 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paph. niveum*)



ภาพผนวกที่ 6 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีช่องอ่างทอง (*Paph. x Ang Thong*)



ภาพผนวกที่ 7 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีฟาหอย (*Paph. bellatulum*)



ภาพผนวกที่ 8 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีคางคกสีแดง (*Paph. appletonianum*)



ภาพผนวกที่ 9 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีคางกบ (*Paph. callosum*)



ภาพผนวกที่ 10 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีสุขะกุล (*Paph. sukhakulii*)



ภาพผนวกที่ 11 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีเมืองกาญจน์ (*Paph. parishii*)



ภาพผนวกที่ 12 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ (*Paph. villosum*)



ภาพผนวกที่ 13 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ลาว (*Paph. gratrixianum*)



ภาพผนวกที่ 14 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีคอยตุง (*Paph. charlesworthii*)



ภาพผนวกที่ 15 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีตุงกาญจน์ (*Paph. sp.*)



ภาพผนวกที่ 16 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paph. exul*)



ภาพผนวกที่ 17 ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองเลย (*Paph. hirsutissimum*)