ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย LB (Luria Bertaini) medium (Sambrook, *et. al.*, 1989)

Bacto-Tryptone	10	กรัม
Bacto-Yeast extract	5	กรัม
NaCl	5	กรัม
เติมน้ำให้ได้	1000	มิลลิลิตร

2. เอนไซม์ RNase A

เตรียมโดยการชั่ง RNase A 10 มิลลิกรัม และละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร แล้วต้มในน้ำเดือด 10 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บที่ – 20 °C เอนไซม์จะยังคงทำงานได้ดีแม้จะผ่านการ Freeze-thaw หลายครั้ง

3. การเตรียมยาปฏิชีวนะ (Maniatis *et al.*, 1982)

3.1 Ampicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง Ampicillin sodium salt 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง Kanamycin 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

3.3 Tetracyclin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง Kanamycin 10 มิลลิกรัม ละลายใน 50 % (v/v) เอทธานอล ที่ปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

4. สารละลายในการสกัดโครโมโซม (Doyle and Doyle, 1990)

4.1 CTAB isolation

- 2% (v/v) CTAB
- NaCl ความเข้มข้น 1.4 โมลาร์
- 0.2% (v/v) 2-mercaptoethanol

4.2 Phenol: Chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1 v/v)

ทำการผสม Chloroform และ Isoamyl alcohol ด้วยอัตราส่วน 24 :1 ไปผสมกับสารฟีนอลอิ่มตัวปริมาตรที่เท่ากัน ส่วนใหญ่จะผสมกับฟีนอลอิ่มตัวเมื่อจะใช้ ถ้าต้องการจะเก็บไว้ทีหลังผสมกันแล้ว ให้เติม 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 เพื่อปิดสารละลายเก็บในขวดสีเข้มที่ 4 °C

4.3 Wash buffer

- 76% (v/v) Ethanol
- ammonium acetate ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

5. TE buffer

- Tris-HCl pH 7.4 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์
- EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

6. TAE buffer (50x)

- Tris. Base 242 กรัม
- glacial acetatic acid ปริมาตร 57.1 มิลลิลิตร
- EDTA (pH 8.0) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

7. Ethidium bromide (10 มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)

Ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร กวนด้วยการใช้ magnetic sterrer จนกว่าจะละลาย ห่อ ด้วย Foil หรือ เก็บใส่ขวดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง ต้องสวมถุงมือระหว่างเตรียม ระวังอย่าหายใจเอาผง Ethidium bromide เข้าไประหว่างการเตรียม

8. Sodium acetate pH 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์

ชั่ง Sodium acetate 408.1 กรัม ละลายในน้ำให้ได้ปริมาตรประมาณ 750 มิลลิลิตร เติม Glacial acetic acid จนได้ pH 5.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และ sterile โดยการ Autoclave

9. EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ชั่ง Disodium ethylenediamine tetraacetate●2 H_2O 136.1 กรัม เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนอย่างแรงโดยการใช้ Magnetic sterrer เติมเกล็ด NaOH ลงไปให้ได้ pH 8.0 ปรับปริมาตร ให้ได้ 1000 มิลลิลิตร แล้ว Autoclave

10. สารละลาย STET ที่ใช้ในการสกัด plasmid (Holmes และ Quiqley, 1981)

- 8 % sucrose
- 0.1 % Triton X-100
- EDTA ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์
- Tris pH 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

11. การเตรียม $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1 โมลาร์

ละลาย $MgCl_2$ ●$6H_2O$ 20.3 กรัมในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไป Autoclave

12. การเตรียม 10 % SDS

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร อาจอุ่นจนละลาย เก็บที่ อุณหภูมิห้อง

13. การเตรียม 1 M Tris-HCl

ละลาย Tris base 121.1 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH โดยการใช้กรด HCl เข้มข้นจนกระทั่งได้ pH ที่ต้องการ แล้วปรับปริมาตรจนได้ 1000 มิลลิลิตร sterile ด้วยการ Autoclave

14. การเตรียม 50x TAE buffer สำหรับอิเล็คโตรฟอรีซีส (Sambrook *et al.*, 1989) ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง Tris base 242 กรัม ละลายใน Acetic acid 57.1 มิลลิลิตร และ 0.5 M EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร ก่อนนำไปใช้เจือจางให้เป็น 1xTAE buffer ด้วยน้ำกลั่น

15. ปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการทดลอง

- ปาล์มน้ำมันคู่ผสม 105 เกิดจากการผสมตัวเองของปาล์น้ำมันต้น CAM237:666T Ekona Tenera 2/1301T Self ของศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี

- ปาล์มน้ำมันคู่ผสม 109 เกิดจากการผสมตัวเองของปาล์มน้ำมันต้น IRH629:316T Lame Tenera WA11 Self ของศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี
- ปาล์มน้ำมันคู่ผสม 116 เกิดจากการผสมตัวเองของปาล์มน้ำมันต้น DAM585:343T Composite ของศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี

ปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นต้นพ่อ-แม่เป็นเทเนอราทั้งหมดดังนั้นเมื่อทำการผสมตัวเองประชากรที่ได้จึงมีทั้ง เทเนอรา ดูรา พิสิเฟอรา ซึ่งนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

16. รหัส IUB

A = adenosine	S = G or C (Strong-3H bonds)
C = cytosine	W = A or T (Weak-2H bonds)
G = guanosine	Y = C or T (pyrimidine)
T = thumidine	B = C, G or T
U = uracil	D = A, G or T
K = G or T (keto)	H = A, C or T
M = A or C (amino)	V = A, C or G
R = A or G (purine)	N = A, T, C, G

17. ค่าความเหมือนของกรดอะมิโน

หมายเลขกลุ่ม	กรดอะมิโน
1	D N
2	E Q
3	S T
4	K R
5	F Y W
6	L I V M

18. คำย่อ และขนาดน้ำหนักโมเลกุลของกรดอะมิโน

กรดอะมิโน	คำย่อ แบบ 3 อักษร	สัญลักษณ์แทน	น้ำหนักโมเลกุล (Da)
Alanine	Ala	A	89
Arginine	Arg	R	174
Asparagine	Asn	N	132
Aspartic acid	Asp	D	133
Asparagine or Aspartic acid	Asx	B	-
Cysteine	Cys	C	121
Glutamine	Gln	Q	146
Glutamic acid	Glu	E	147
Glutamine or Glutamic acid	Glx	Z	-
Glycine	Gly	G	75
Histidine	His	H	155
Isoleucine	Lle	I	131
Leucine	Leu	L	131
Lysine	Lys	K	146
Methionine	Met	M	149
Phenylalanine	Phe	F	165
Proline	Pro	P	115
Serine	Ser	S	105
Threonine	Thr	T	119
Tryptophan	Try	W	204
Tyrosine	Tyr	Y	181
Valine	Val	V	117

19. การใช้โปรแกรม Sicon Image หาค่าการแสดงออกของ *accD*

โดยเลือกไฟล์ภาพที่ได้จากการทำ Gel electrophoresis ผลผลิต RT-PCR ของยีน *accD* และยีน *actin* ที่มีนามสกุลเป็น *.TIF ทำการ duplicate ภาพแล้วเปลี่ยนภาพเป็น invert ทำการวัดเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับความกว้างของช่องสำหรับ run gel electrophoresis โดยการใช้ จาก Tools ลากวัดระยะความกว้างของแถบดีเอ็นเอในภาพแล้ว กด Analyze เลือก Set Scale เปลี่ยนหน่วยของ Units เป็น Millimeters ซึ่งหากระยะความกว้างของแถบดีเอ็นเอในรูปถูกต้องค่าที่ได้ในช่อง Scale จะมีค่าเท่ากับค่าความกว้างของช่องสำหรับ run gel electrophoresis จากนั้นกด OK แล้วเลือก Load Macro จาก Special เพื่อทำการโหลด Measure จาก C:\Program File\Scion Coorporation\Scion Imagae\Macro.txt แล้วเลือก จาก Tools ลากครอบคลุมบริเวณแถบผลผลิต RT-PCR ของยีน *accD* และยีน *actin* ที่ต้องการเลือก Measure sum of pixel values จาก Special ซึ่งสามารถจะทราบผลการวัดปริมาณความเข้มของผลผลิต PCR ได้โดย กด Analyze เลือก Show result เมื่อทำการวัดปริมาณความเข้มของผลผลิต PCR ที่ต้องการได้ทั้งหมดสามารถที่จะเก็บผลข้อมูลได้ด้วยการกด Analyze เลือก Option เลือกหัวข้อที่จะต้องการส่งข้อมูล เลือก OK จากนั้นเลือก File กด Export แล้วข้อมูลในชื่อไฟล์ *.Measurement แล้วทำการประมวลผลต่อด้วยโปรแกรม Excel