เอกสารอ้างอิง

พงศ์เทพ อัครธนกุล. 2528. ว่าด้วยผึ้งและการเลี้ยงผึ้ง. พิมพ์ครั้งที่ 2. ไทยวัฒนาพานิช: กรุงเทพ. หน้า 1-19.

วัลยา อุทัยสาง. 2537. การเตรียมดีเอ็นเอติดตามเพื่อวิเคราะห์ความแปรผันของสายพันธุ์ผึ้งโพรง *Apis cerana* . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 14-32.

ศิริพร สิทธิประณีต. 2531. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. 1,000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. ส. วิชาการพิมพ์: กรุงเทพ.

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2532. ชีววิทยาของผึ้ง. พิมพ์ครั้งที่ 2. ต้นอ้อ: กรุงเทพ. หน้า 108-113.

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ, ยงยุทธ ไวคกุล และ แสนนัด หงษ์ทรงเกียรติ. 2528. หลักการเลี้ยงผึ้งและขยายพันธุ์ผึ้งในประเทศไทย. สมาคมวิทยาศาสตร์การเกษตร ฯ: กรุงเทพ. หน้า 9-48.

สุรินทร์ ปิยะคณากุล. 2536. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. บางเขน: กรุงเทพ.

Bernatzky, R. 1988. Restriction Fragment Length Polymorphism. In S.B.,Gelvin and Schilperoost (eds.), Plant Molecular Biology Manual. pp C2: 1-18. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht.

Boecking, O., Rath, W. and Drescher, W. 1993. Behavioral Strategies of *Apis mellifera* and *Apis cerana* Against *Varroa jacobsoni.* Internat. J. Acarol. 9 (2): 173-177.

Brown, T.A. 1994. DNA Sequencing: The Basics. Oxford University Press: New York. pp. 27-52.

Byron, A. 1991. A Cladistic Analysis of the Genus *Apis*. In D.R., Smith (ed.), Diversity in the Genus *Apis*. pp. 1-28. Westview Press: Oxford.

Cabb, B.D. and Clarkson, J.M. 1993. Detection of Molecular Variation in the Insect Pathogenic Fungus *Metarhizium* Using RAPD-PCR. FEMS Microbiology Letters 112: 319-324.

Cornuet, J.M., Garnery, L. and Solignac, M. 1991. Putative Origin and Function of the Intergenic Region Between COI and COII of *Apis mellifera* L. Mitochondrial DNA. The Genetics Society of America 1128: 393-403.

Crozier, R.H. and Crozier, Y.C. 1993. The Mitochondrial Genome of the Honeybee *Apis mellifera*: Complete Sequence and Genome Organization. Genetics 133: 97-117.

Crozier, Y.C., Koulianos, S. and Crozier, R.H. 1991. An Improved Test for Africanized Honeybee Mitochondrial DNA. Experientia 47: 968-969.

Davis, L.G., Dibner, M.D. and Battey, J.F. 1986. Basic Method in Molecular Biology. Elsevier Science Publishing: New York.

Gaillard, C. and Strauss, F. 1990. Ethanol Precipitation of DNA with Linear Polyacrylamide as Carrier. Nucleic Acid Research 18(2): 378.

Gan, Y.Y., Gard, W.O., Makhdzir, M. and Tan, S.G. 1991. Allozyme Diversity in Asian *Apis*. In D.R., Smith (ed.), Diversity in the Genus *Apis*. pp. 117-130. Westview Press: Oxford.

Garnery, L., Solignac, M., Celebrono, G. and Cornuet, J.M. 1993. A Simple Test Using Restricted PCR-Amplified Mitochondrial DNA to Study the Genetic Structure of *Apis mellifera* L. Experientia 49: 1016-1021.

Graven [illegible], et al. 1995. Evolution Correlation Between Control Region Sequence and Restriction Polymorphism in the Mitochondrial Genome of a Large Senegalese Mandenka Sample. Mol. Biol. Evol. 12(2): 334-335.

Hall, H.G. 1986. DNA Differances Found Between Africanized and European Honey Bees. Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 4874-4877.

Hall, H.G. 1988. Characterization of the Africanized Honey Bee Genotype by DNA Restriction Fragments. In Africanized Honey Bees and Bee Mites. pp. 287-293. Ellis Harwood: Chichester.

Hall, H.G. and Muralidharan, K. 1989. Evidence from Mitochondrial DNA that African Honey Bees Spread as Continuous Maternal Lineages. Nature 339:211-213.

Hall, H.G. and Smith, D.R. 1991. Distinguishing African and European Honeybee Matrilines Using Amplified Mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 4548-4552.

Higgins, D.G. and Sharp, P.M. 1988. CLUSTAL : A Package for Performing Multiple Sequence Alignment on a Microcomputer. Gene 73: 237-244.

Innis, M.A. and Gelfand, D.H. 1990. Optimization of PCRs. In M.A., Innis, D.H., Gelfand, J.J., Sninsky and T.J., White (eds.), PCR Protocols, pp.3-11. Academic Press: New York.

Koeniger, N. 1985. *Varroa*'s Natural Adaptation to *Apis mellifera*. Bee World 66: 125-126.

Lewin, B. 1990. Genes IV. 4 rd. ed. Oxford University Press: New York. pp. 518-529.

Limbipichai, K. 1990. Morphometric Studies on Eastern Honey Bee (*Apis cerana* Fabricius) in Thailand and Malaysian Penisula. Master's Thesis. Chulalongkorn University.

Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E.F. 1982. Molecular Clonning a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.

Maxam, A.M. and Gilbert, W. 1977. A New Method for Sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci 74: 560.

Meinkoth, J. and Wahl. 1984. Hybridization of Nucleic Acids Immunobilized on Solid Supports. Anal. Biobhem. 138: 267-284.

Moritz, R.F.A., Hawkins, C.F., Crozier, R.H. and Mackinley, A.G. 1986. A Mitochondrial DNA Polymorphism in Honeybees (*Apis mellifera* L.). Experientia 42: 322-324.

Mullis, K.B. and Faloona, F. 1987. Specific Synthesis of DNA In Vitro Via a Polymerase Catalyzed Chain Reaction. Method Enzymol. 155: 335-350.

Myeong, L.Y. 1993. Morphological and Biochemical Characteristics of *Apis cerana* in South Korea. In L.J.,Connor (ed.), Asian Apiculture. pp.161-165. Wicwas Press: Cheshire.

Nopparatana, C. et al. 1994. Automated DNA Sequence Analysis of β-Globin Gene. In S., Fucharoen, P., Winichagoon, C., Kattamis and L., Bernini (eds.), The Detection of Single-Base Mutations: A Laboratory Manual, pp.90-94. Mahidol University: Bangkok.

Perkin Elmer. 1995. DNA Sequencing: Chemistry Guide. Version A. The Perkin Elmer: Norwalk.

Promega. 1991. Promega Protocols and Applications Guide. 2nd ed. Promega: Medison.

Promega. 1996. Technical Manual for OmniBase DNA Cycle Sequencing System. Promega: Medison.

Rinderer, T.E. 1986. Selection. In T.E., Rinderer (ed.), Bee Genetics and Breeding. pp. 23-30. Academic Press: Orlando.

Rodrigues, R.L. and Tait, R.C. 1983. Recombinant DNA Techniques: An Introduction. Addison-Wasley Publishing. pp. 45-46.

Rutter,F. 1988. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag: Berlin. pp. 120-166.

Saiki, R.K., et al. 1985. Enzymatic Amplification of β-Globin Genomic Seguences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. Science 230: 1350-1354.

Sanger, F., Nicklen, S. and Caulson, A.R. 1977. DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463-5467.

Sheppard, S. W., Rinderer, T. E., Mazzoii, J. A., Steizer, J. A. and Shimanuki, H. 1991. Gene Flow between African and European - Derived Honey Bee Populations in Argentina. Nature 349 (6312): 782-784.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. and Flook, P. 1994. Evolution, Wighting, nd Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. Entomological Society of America 87(6): 651-686.

Smith, D.R. Personal Communication.

Smith, D.R. and Brown, W.M. 1988. Polymorphisms in Mitochondrial DNA of European and Africanized Honeybees (*Apis mellifera*). Experientia 44: 257-260.

Smith, D.R. and Brown, W.M. 1990. Restriction Endonuclease Cleavage Site and Length Polymorphisms in Mitochondrial DNA of *Apis mellifera mellifera* and *A. m. carnica* (Hymenoptera: Apidae). Entomological Society of America 83(1): 81-88.

Smith, D.R., Taylor, O.R. and Brown, W.M. 1989. Neotropical African Bees Have African Mitochondrial DNA. Nature 339: 213-215.

Swofford,D.L. 1990. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.0L. Illinois Natural Hist. Surv.: Champaign, IL.

Sydney, A.C. 1991. A New Tribal Phylogeny of the Apidae Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. In D.R., Smith (ed.), Diversity in the Genus *Apis*, pp. 71-88. Westview Press: Oxford

Sylvester, H.A., and Wongsiri, S. 1993. DNA Analysis of Genetic Variation in Asian Honey Bees. In L.J., Connor (ed.), Asian Apiculture, pp. 156-160. Wicwas Press: Cheshire.

Wongsiri, S. and Tangkanasing, P. 1986. *Apis cerana* F. Beekeeping in Thailand: Problems and Research Needs. J. Sci. Res. Chula. Uni. 11(1): 1-6.

Wongsiri, S, Tangkanasing, P. and Sylvester, H.A. 1987. Mites, Pests and Beekeeping with *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Thailand. American Bee Journal 127 (7): 500-503.

Wongsiri, S. Rinderer, T.E. and Sylvester, H.A. 1991. Biodiversity of Honey in Thailand. Bee Biology Research Unit: Chulalongkorn University.

Wongsiri, S., You-Sheng, L. and Sylvester, H.A. 1990. Queen Rearing with *Apis cerana* . American Bee Journal 130 (1): 32-35.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลาย

1.1 สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

สารละลาย Tris-HCl ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์, pH 7.5

ละลาย Tris base 1.21 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วยกรด hydrochloric หรือสารละลาย sodium hydroxide ที่เจือจาง ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และทำให้ไร้เชื้อโดยการ autoclave

สารละลาย Na_2EDTA ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์, pH 8.0

ละลาย disodium ethylene diamine tetraacetate.$2H_2O$ (Na_2EDTA) จำนวน 1.861 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร คนด้วยเครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) แล้วเติมสารละลาย sodium hydroxide จน pH เท่ากับ 8.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และทำให้ไร้เชื้อโดยการ autoclave

สารละลาย sodium chloride ที่ความเข้มข้น 5 โมลาร์

ละลาย sodium chloride จำนวน 2.922 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และทำให้ไร้เชื้อโดยการ autoclave

สารละลาย sodium acetate ที่ความเข้มข้น 5 โมลาร์, pH 7.4

ละลาย sodium acetate.$3H_2O$ 1.36 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.4 โดยการเติมกรด acetic ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และทำให้ไร้เชื้อโดยการ autoclave

สารละลายบัฟเฟอร์ STE

ผสมสารละลายต่อไปนี้ให้เข้ากันในหลอดแก้วไร้เชื้อ

สารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์, pH 7.5	5.0	มิลลิลิตร
สารละลาย Na_2EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0	0.2	มิลลิลิตร
สารละลาย sodium chloride 5 โมลาร์	2.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นไร้เชื้อ

ภาคผนวก 1(ต่อ)

สารละลายบัฟเฟอร์ TEN

ผสมสารละลายต่อไปนี้ให้เข้ากันในหลอดแก้วไร้เชื้อ

สารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์, pH 7.5	100	ไมโครลิตร
สารละลาย Na_2EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0	20	ไมโครลิตร
สารละลาย sodium chloride 5 โมลาร์	20	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นไร้เชื้อ

สารละลาย Proteinase K ที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลาย Proteinase K 10 มิลลิกรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ TEN จำนวน 1 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วไร้เชื้อ อุ่นที่ 37°ซ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง สารละลายนี้เก็บได้เป็นเวลานานที่ -20°ซ

สารละลายบัฟเฟอร์ RNase

ผสมสารละลายต่อไปนี้ให้เข้ากันในหลอดแก้วไร้เชื้อ

สารละลาย sodium acetate 1 โมลาร์ pH 7.4	1	มิลลิลิตร
สารละลาย Na_2EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0	6	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นไร้เชื้อ

สารละลาย RNase A ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลาย Pancreatic Ribonuclease A จำนวน 10 มิลลิกรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ RNase A จำนวน 1 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วไร้เชื้อ อุ่นที่ 80°ซ เป็นเวลา 10 นาที ก่อนใช้ทุกครั้ง เก็บสารละลายนี้ได้เป็นเวลานานที่ -20°ซ

สารละลายบัฟเฟอร์ TE

สมสารละลายต่อไปนี้เข้าด้วยกันในหลอดแก้วไร้เชื้อ

สารละลาย Tris-HCl 1 โมลาร์, pH 8.0	100	ไมโครลิตร
สารละลาย Na_2EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0	20	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่นไร้เชื้อ

ภาคผนวก 1 (ต่อ)

สารละลาย SDS ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซนต์

ละลาย sodium dodecyl sulfate (sodium lauryl sulfate) 2 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร นำไปอุ่นที่ 68°ซ จนละลายหมด ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น (ห้าม autoclave)

สารละลาย phenol, pH 7.5

นำผลึก phenol มาทำให้หลอมเหลวในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 65°ซ (ปิดฝาให้แน่น เนื่องจาก phenol เป็นอันตรายต่อระบบประสาท) นำมาทำให้อิ่มตัวในบัฟเฟอร์ TE โดยเติมบัฟเฟอร์ TE ในปริมาณที่เท่ากับปริมาตรของ phenol เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น ดูดชั้นของบัฟเฟอร์ TE ซึ่งอยู่ชั้นบนทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ TE ลงไปใหม่ ทำเช่นเดิมจนกว่า phenol จะมี pH ประมาณ 7.5 โดยใช้กระดาษวัด pH

1.2 สารละลายสำหรับทำ agarose gel electrophoresis

สารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE และ 10X TBE

เตรียม 10X TBE โดยละลาย Tris base 10.8 กรัม, boric acid 5.5 กรัม และ Na_2EDTA 0.93 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 10X TBE นี้ให้เป็น 1X TBE โดยเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ลงใน 10X TBE จำนวน 100 มิลลิลิตร

สารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE และ 50X TAE

เตรียม 50X TAE โดยละลาย Tris base 24.2 กรัม glacial acetic acid 5.71 มิลลิลิตร และ Na_2EDTA 3.72 กรัม ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 10X TAE นี้ให้เป็น 1X TAE โดยเติมน้ำกลั่น 980 มิลลิลิตร ลงใน 50X TAE จำนวน 20 มิลลิลิตร

agarose 0.7 เปอร์เซนต์ และ 1.5 เปอร์เซนต์

ชั่ง agarose 0.7 หรือ 1.5 กรัม (ตามเปอร์เซนต์ที่ต้องการ) ใส่ลงในบัฟเฟอร์ 1X TBE หรือ 1X TAE จำนวน 100 มิลลิลิตร ต้มและคนให้ละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50°ซ ก่อนนำมาเทลงใน gel chamber

ภาคผนวก 1 (ต่อ)

สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับ loading

ละลาย bromophenol blue 2.5 มิลลิกรัม xylene cyanol 2.5 มิลลิกรัม ficoll 400 จำนวน 4 กรัม และ SDS 10 มิลลิกรัม ลงในน้ำกลั่นไร้เชื้อจำนวน 8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ

สารละลาย ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลาย ethidium bromide 5 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล (สวมถุงมือขณะเตรียม เนื่องจากสาร ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง)

1.3 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/HindIII)

λ-DNA (500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	50	ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์ 10X Reaction 2	20	ไมโครลิตร
BSA	20	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	109	ไมโครลิตร
HindIII (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร

อุ่นที่อุณหภูมิ 37°ซ ข้ามคืน จากนั้นเติม

บัฟเฟอร์สำหรับ loading	200	ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์ TE	600	ไมโครลิตร

1.4 สารละลายสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สารละลายของ primer ที่ความเข้มข้นเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

primer 1 มีขนาด 20 nucleotides (มวลโมเลกุล 6026.00) น้ำหนัก 67.2 ไมโครกรัม ละลายในน้ำกลั่น (ddH_2O) ที่ไร้เชื้อ จำนวน 1.12 มิลลิลิตร

primer 2 มีขนาด 20 nucleotides (มวลโมเลกุล 6099.00) น้ำหนัก 67.2 ไมโครกรัม ละลายในน้ำกลั่น (ddH_2O) ที่ไร้เชื้อ จำนวน 1.10 มิลลิลิตร

primer 3 มีขนาด 18 nucleotides (มวลโมเลกุล 5586.60) น้ำหนัก 67.2 ไมโครกรัม ละลายในน้ำกลั่น (ddH_2O) ที่ไร้เชื้อ จำนวน 1.20 มิลลิลิตร

ภาคผนวก 1 (ต่อ)

สารละลาย deoxynucleoside triphosphate (dNTP) ความเข้มข้นของ dNTP แต่ละชนิด (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) เป็น 2.5 มิลลิโมลาร์

นำ dNTP เข้มข้นชนิดละ 10 มิลลิโมลาร์ มาผสมในอัตราส่วนที่เท่ากัน เก็บที่ -20°ซ

1.5 สารละลายสำหรับตกตะกอนดีเอ็นเอ

สารละลาย acrylamide ที่มีความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซนต์

ชั่ง acrylamide จำนวน 5 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายที่ประกอบด้วย Tris-HCl ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 40 ไมโครลิตร sodium acetate ที่มีความเข้มข้น 3 โมลาร์ จำนวน 6.7 ไมโครลิตร และ Na_2EDTA ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 2 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรเป็น 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม ammonium persulfate ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ จำนวน 10 ไมโครลิตร และ TEMED จำนวน 1 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เกิด polymerization เป็นเวลา 30 นาที นำมาตกตะกอนในเอทธานอล จำนวน 2.5 มิลลิลิตร แล้วนำตะกอนมาละลายในน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 มิลลิลิตร

สารละลาย potassium chloride ที่ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์

ชั่ง potassium chloride (KCl) 7.65 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปทำให้ไร้เชื้อโดยการ autoclave

1.6 สารละลายสำหรับหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ

สารละลาย acrylamide ที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซนต์

ชั่ง acrylamide 7.6 กรัม, N,N'methylene bisacrylamide 0.4 กรัม, urea 42 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 10X TBE 10 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

สารละลาย ammonium persulfate ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์

ชั่ง ammonium persulfate 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร (เมื่อใช้จึงเตรียมขึ้นใหม่)

ภาคผนวกที่ 2 แสดงการหาค่า Tm ของ primer ทั้ง 3 ชนิด

2.1 primer 1 (20 mer)

ลำดับเบสเป็น 5′-TCTATACCACGACGTTATTC-3′

เบส	จำนวน
A	5
C	6
G	2
T	7

Tm = [2 (A+T) + (C+G)]

= [2 (5+7) + (6+2)] = 56°ซ

2.2 primer 2 (20 mer)

ลำดับเบสเป็น 5′-GATCAATATCATTGATGACC-3′

เบส	จำนวน
A	7
C	4
G	3
T	6

Tm = [2 (7+6) + 4 (4+3)] = 54°ซ

2.3 primer 3 (18 mer)

ลำดับเบสเป็น 5′-GGCAGAATAAGTGCATTG-3′

เบส	จำนวน
A	6
C	2
G	6
T	4

Tm = [2 (6+4) + 4 (2+6)] = 52°ซ

ภาคผนวกที่ 3 องค์ประกอบของ nucleotide mix ของชุดหาลำดับเบส

Omnibase DNA cycle sequencing system (Promega,1996)

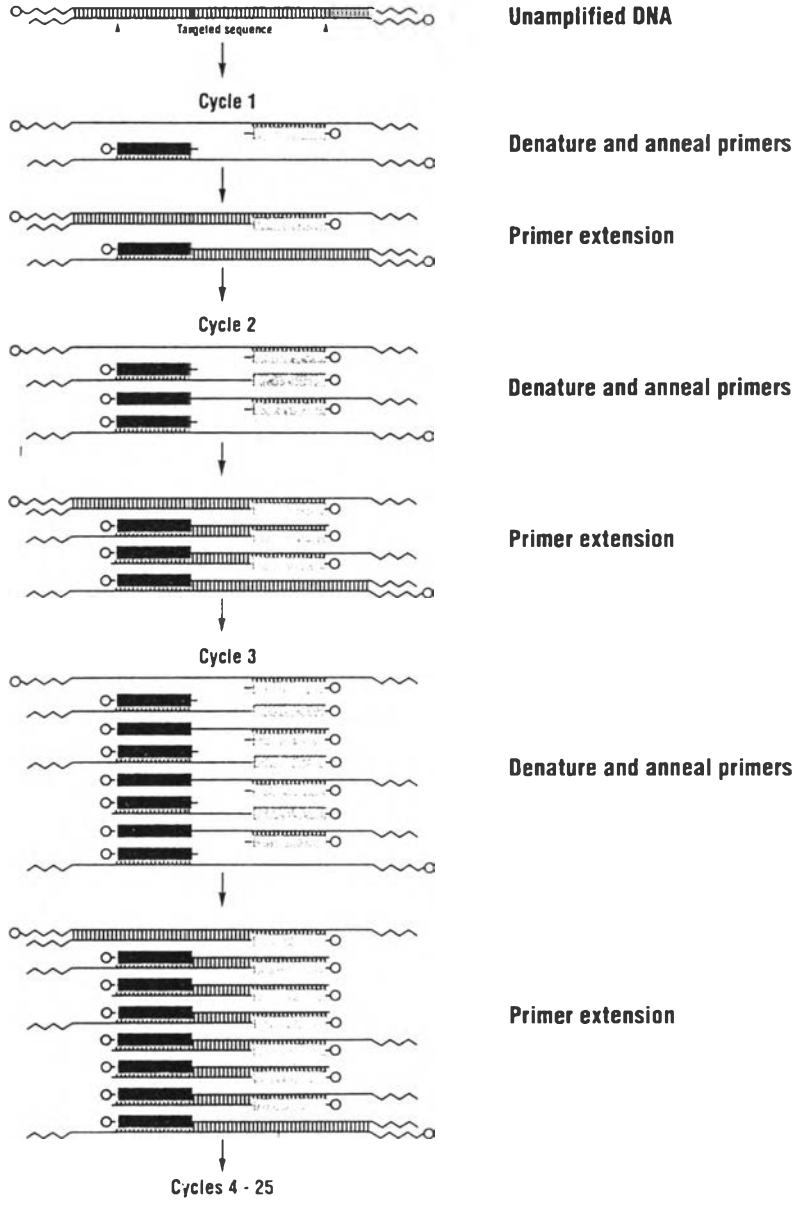
องค์ประกอบ	G mix	A mix	T mix	C mix
ddGTP	0.3 μM	-	-	-
ddATP	-	0.2 μM	-	-
ddTTP	-	-	0.25 μM	-
ddCTP	-	-	-	0.25 μM
7-Deaza dGTP	20 μM	20 μM	20 μM	20 μM
dATP	20 μM	20 μM	20 μM	20 μM
dTTP	20 μM	20 μM	20 μM	20 μM
dCTP	20 μM	20μM	20 μM	20 μM

ภาคผนวกที่ 4 แสดงลำดับเบสของ mtDNA ในส่วน COI ถึง COII ของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera ligustica*) ที่ศึกษาโดย Crozier และ Crozier (1993)

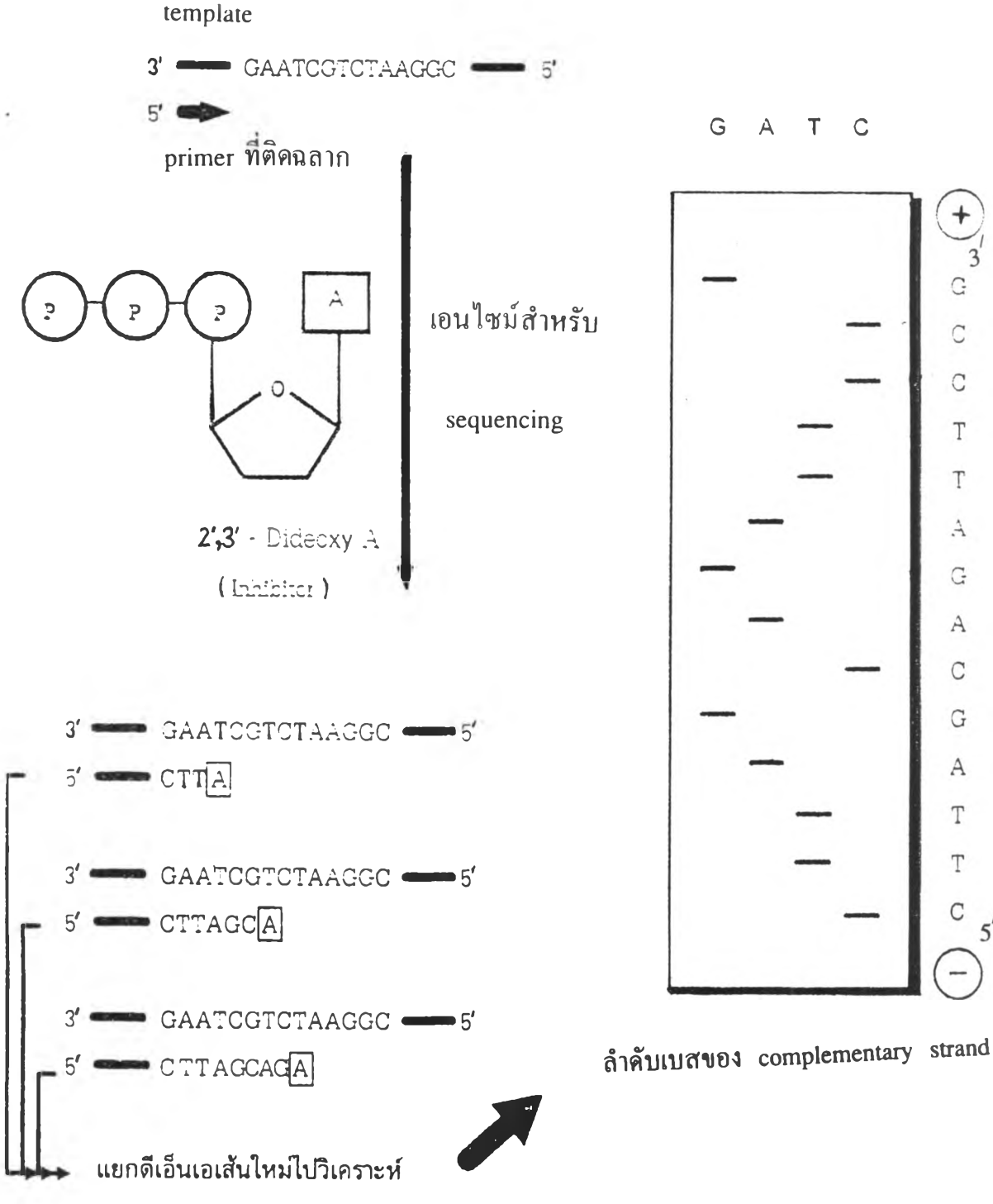
```
     COI →
1792 taataataa
1801 agtgattcat atcaaccaat cataaaaata ttgggatctt gtatattatt ctagctttat
1861 gatctggaat actaggatca tcaatgagac ttattattcg aatagaatta agatccccag
1921 gatcatgaat tagcaatgat caaatttata atacaattgt tactagtcat gcattcctaa
1981 taatttttt tatagttata ccatttttaa ttggaggatt tggaaattgg cttattcctt
2041 taatactagg atcacctgat atagcattcc cccgaataaa taatattaga ttttgattac
2101 ttcctccctc attatttata cttttattaa gaaatttatt ttatccaaga ccaggaactg
2161 gatgaacagt atatccacca ttatcagcat atttatatca ttcttcacct tcagtagatt
2221 ttgcaatttt ttctcttcat atatcaggaa tttcctcaat tataggatca ttaaacttaa
2281 tagttacaat tataataata aaaaattttt ctataaatta tgaccaaatt tcattatttc
2341 catgatcagt ttttattaca gcaattttat taattatatc attacctgta ttagctggag
2401 caattactat actattattt gatcgaaatt ttaatacatc atttttcgat cctataggag
2461 gtggagatcc aattctttat caacatttat tttgattttt tggtcatcca gaagtttata
2521 ttttaatttt acctggattt ggattaatct ctcatattgt aataaatgaa agaggaaaaa
2581 aagaaatttt tggtaattta agaataattt atgcaatatt aggaattgga tttctaggtt
2641 ttattgtttg agcacatcac atatttacag tcggattaga tgttgatact cgagcatatt
2701 ttacttcagc aacaataatc attgctgtac caacaggaat taaagttttt agatgattag
2761 caacttatca tggttcaaaa ttaaaattaa atatttcaat tttatgatca ctaggtttta
2821 ttatactatt tactattggt ggattaacag gaattatatt atcaaattct tctattgata
2881 ttattcttca tgatacatat tacgttgttg gacattttca ttatgttctt tcaataggtg
2941 cagtatttgc aattatttca agatttattc attgatatcc attaattact ggattattat
3001 taaatattaa atgattaaaa attcaattta ttataatatt tattggagta aatctaactt
3061 tctttcctca acatttttta ggactaatat ctataccacg acgttattca gactatccag
3121 attcttatta ctgttgaaat tcaatttcat ctataggatc aataatttca ttaaatagaa
3181 taatttttt aatttttatt attttagaaa gattaatttc taaacgaata ttattattta
3241 aattcaacca atcatcactt gaatgattaa atttttacc acctctagat cattcacatt
                                                          **-----
3301 tagaaattcc attattaatt aaaaatttaa atttaaaatc aattttaatt aaattttaat
     tRNA^leu ----------------------------------------------------------
3361 atggcagaat aagtgcattg aacttaagat tcaaatataa agtattttta aacttttatt
     ---*
3421 aaaatttccc cacttaattc atattaattt aaaaataaat taataacaat ttttaataaa
3541 tttattaaaa ttaataaatt aatataaaat aaaacaaaat ataacagaat atatttatta
                        COII →
3601 aaatttaatt tattaaaatt tccacatgat ttatatttat atttcaagaa tcaaattcat
3661 attatgctga taatttaatt tcatttcata atatagttat aataattatt attataattt
3721 caacattaac tgtatatatt attttagatt tatttataaa caaattctca aatttatttt
3781 tattaaaaaa tcataatatt gaaattattt gaacaattat tccaattatt attctattaa
3841 ttatttgttt tccatcatta aaaattttat atttaattga tgaaattgta aatccttttt
3901 tttcaattaa atcaattggt catcaatgat attgatcata tgaatatcca gaatttaata
3961 atattgaatt tgattcatat atactaaatt ataataattt aaaccaattt cgtttactag
4021 aaactgataa tcgaatagta attccaataa aaatcccact acgtttaatt acaacatcaa
4081 cagatgtaat tcattcatga acagttccat ccttaggtat taaagttgat gcagttccag
4141 gacgaattaa tcaattaaat ttaattagaa aacgtccagg aatttttttt ggtcaatgtt
4201 cagaaatttg tggtataaat catagattta taccaattat aattgaatca acttcatttc
4261 aatatttttt aaattgagta aataaacaaa tct
```

หมายเหตุ ส่วนที่ขีดเส้นใต้เป็นบริเวณที่นำมาออกแบบ primer

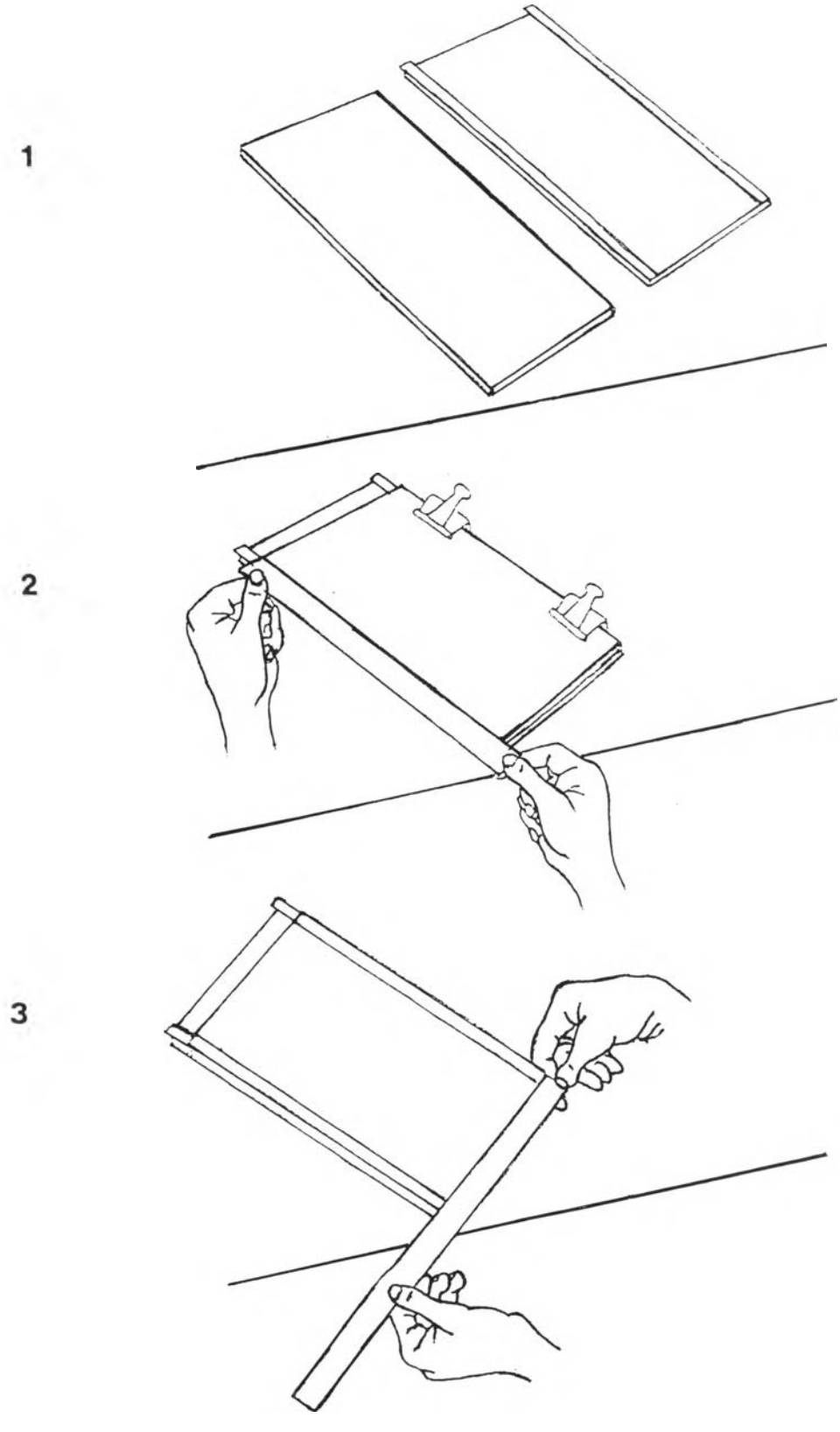
ภาคผนวกที่ 5 แสดงปฏิกิริยาของ PCR ในแต่ละรอบ



ภาคผนวกที่ 6 ปฏิกิริยาการหาลำดับเบสและวิธีการอ่านผลจากแผ่นฟิล์ม

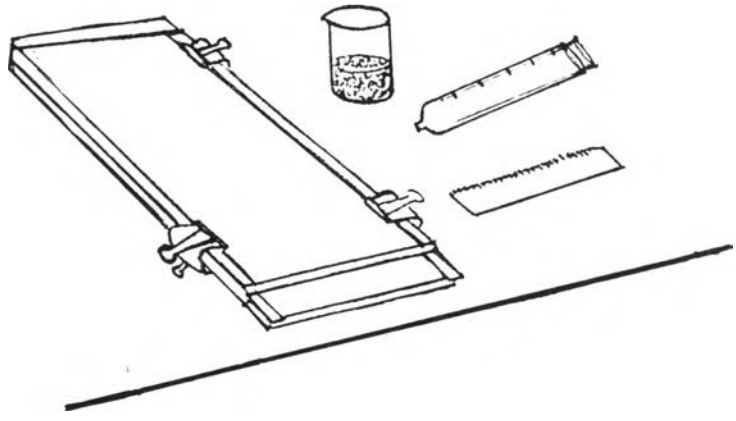


ภาคผนวกที่ 7 แสดงขั้นตอนการเตรียมเจลสำหรับหาลำดับเบส

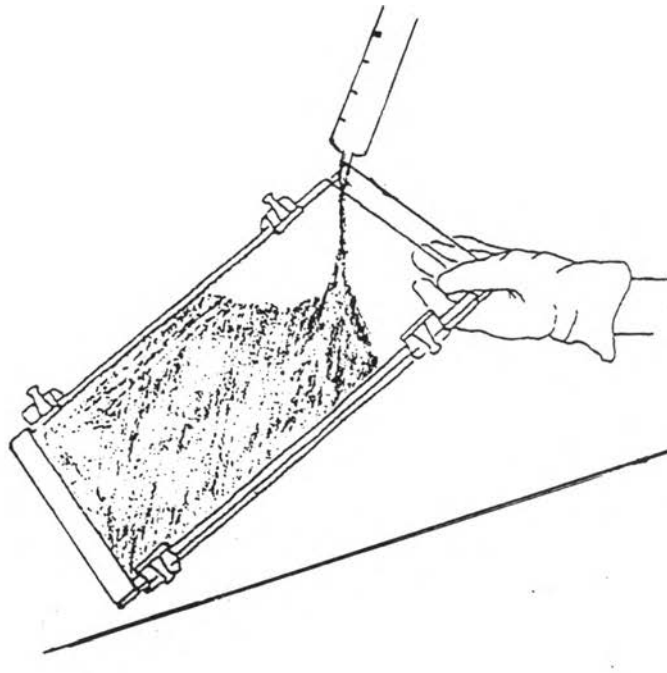


ภาคผนวกที่ 7 (ต่อ)

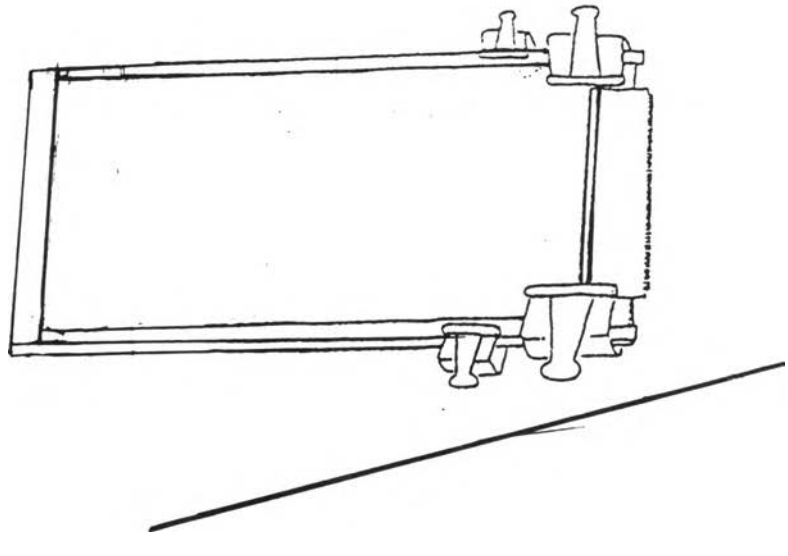
4



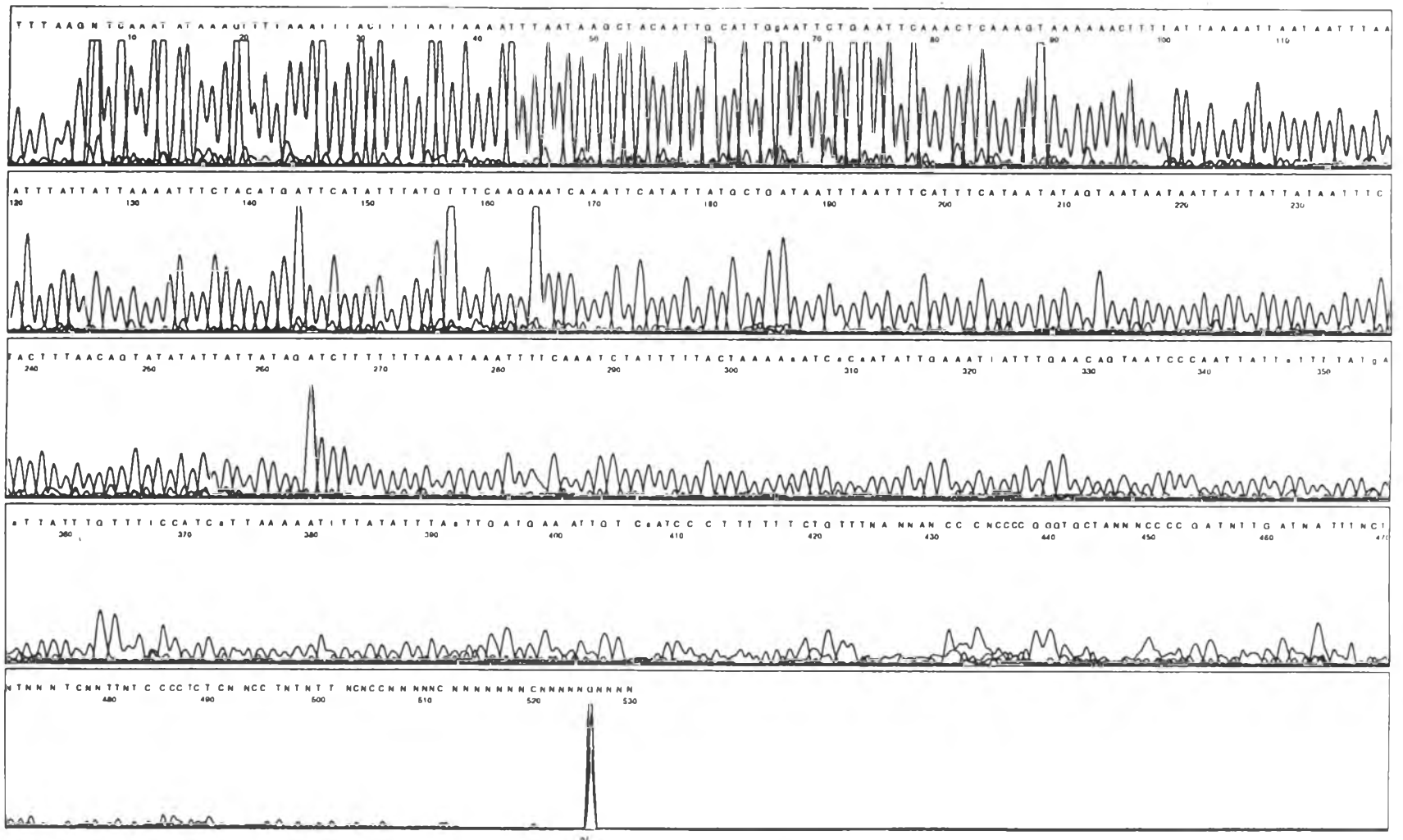
5



6

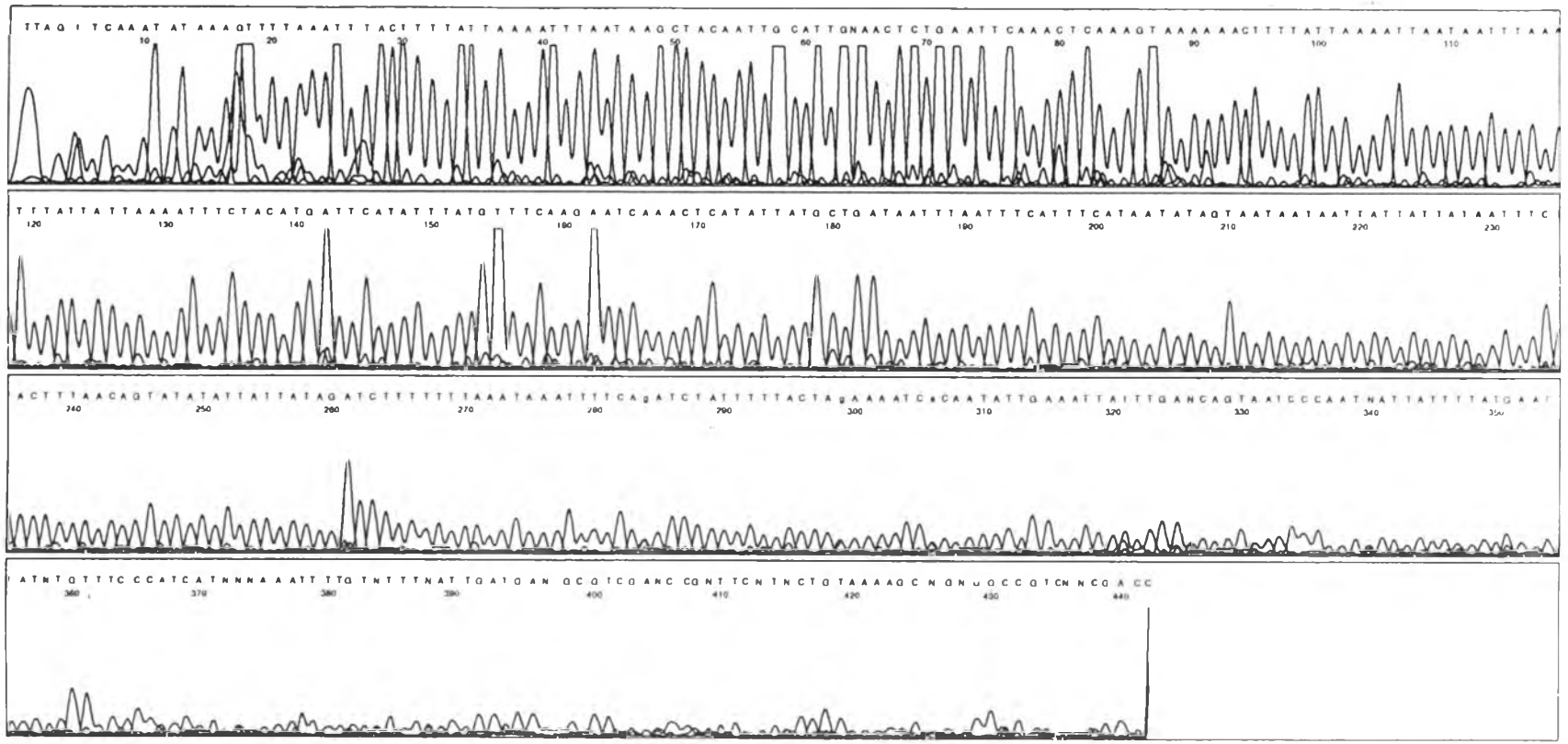


ภาคผนวกที่ 8 CCD Spectrograph แสดงผลการหาลำดับเบสด้วยเครื่องอัตโนมัติ (Automated DNA Sequencing)



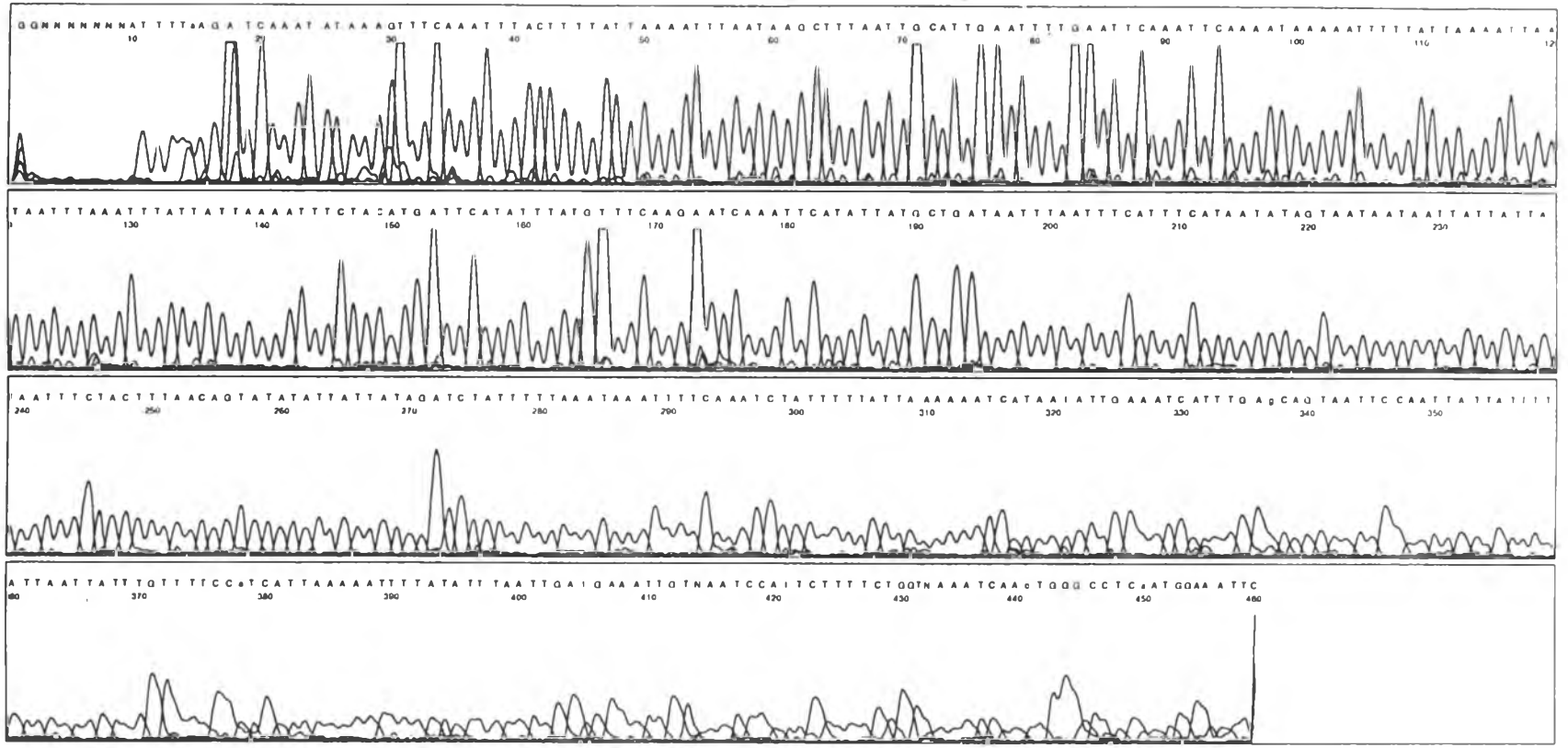
ผึ้งโพรงจากจังหวัดอุตรดิตถ์

ภาคผนวกที่ 8 (ต่อ)



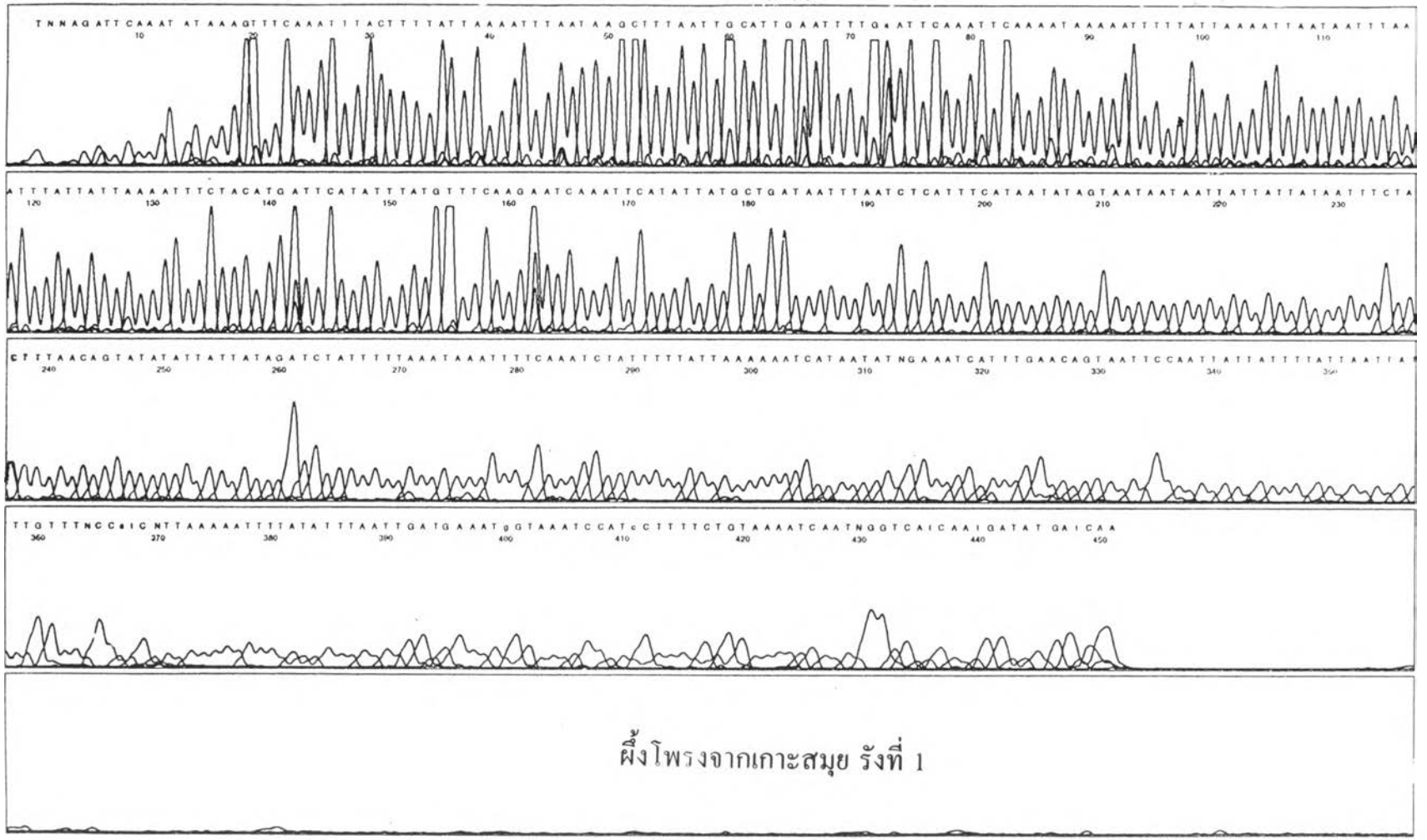
ผึ้งโพรงจากจังหวัดสกลนคร

ภาคผนวกที่ 8 (ต่อ)

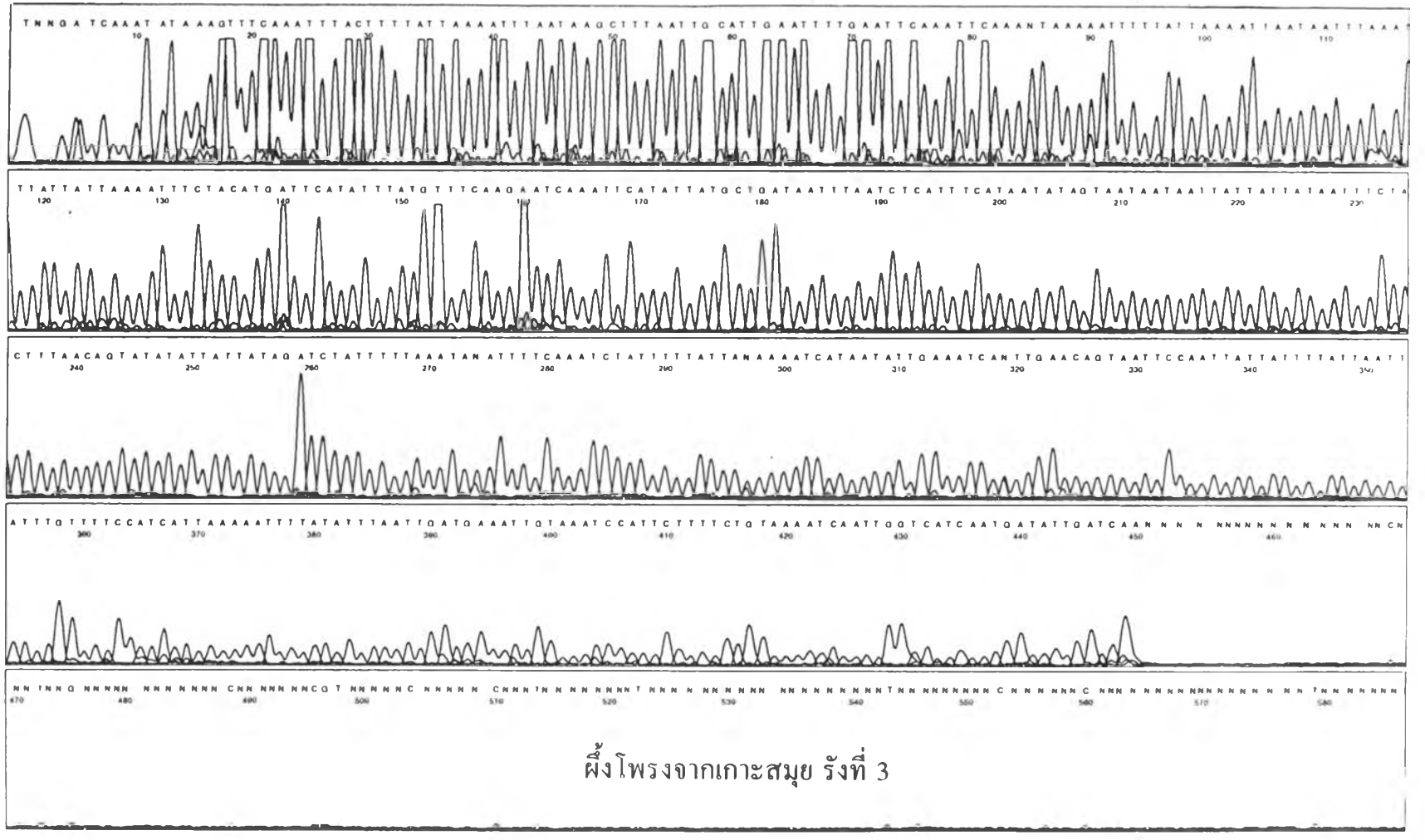


ผึ้งโพรงจากจังหวัดสุราษฎ์ธานี รังที่ 1

ภาคผนวกที่ 8 (ต่อ)

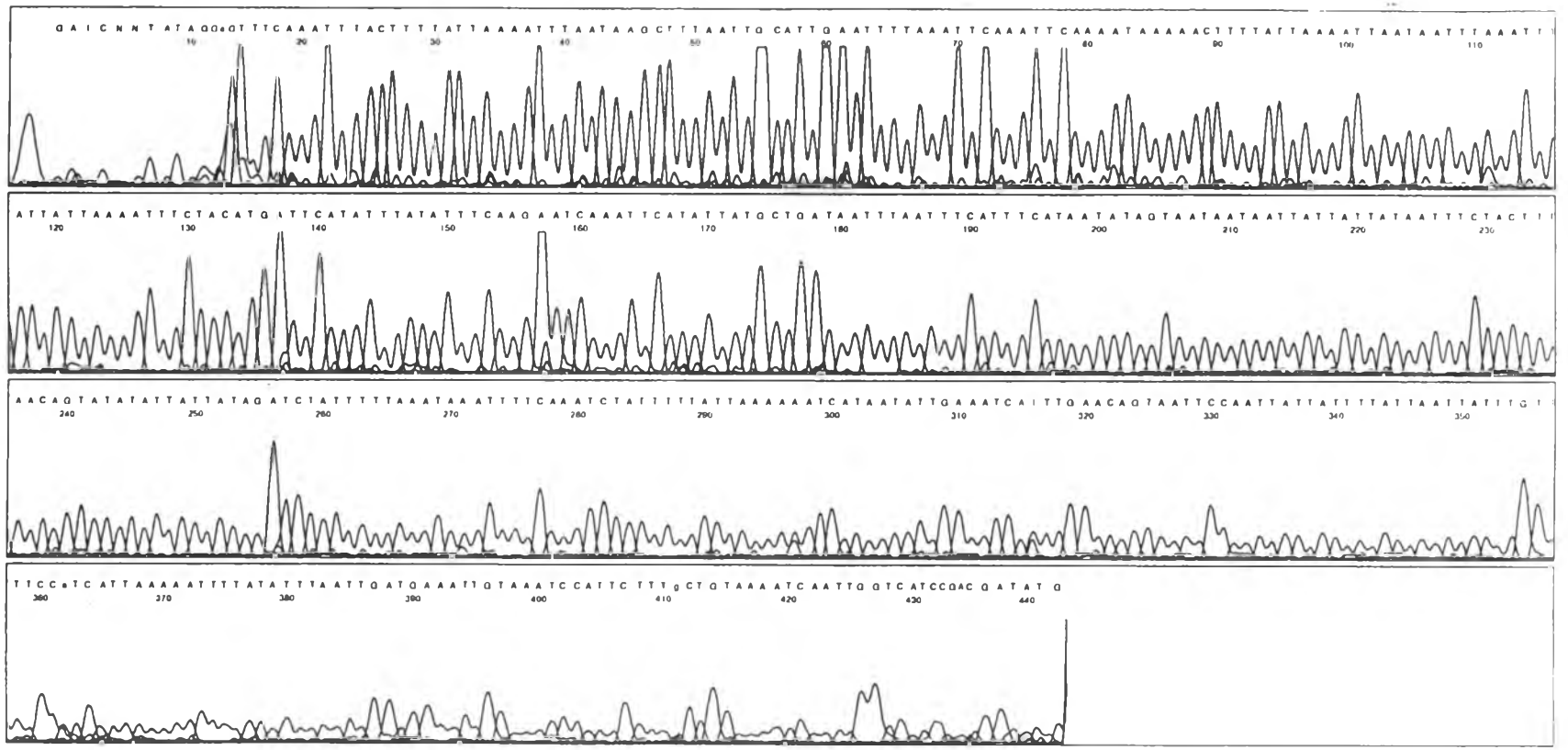


ภาคผนวกที่ 8 (ต่อ)



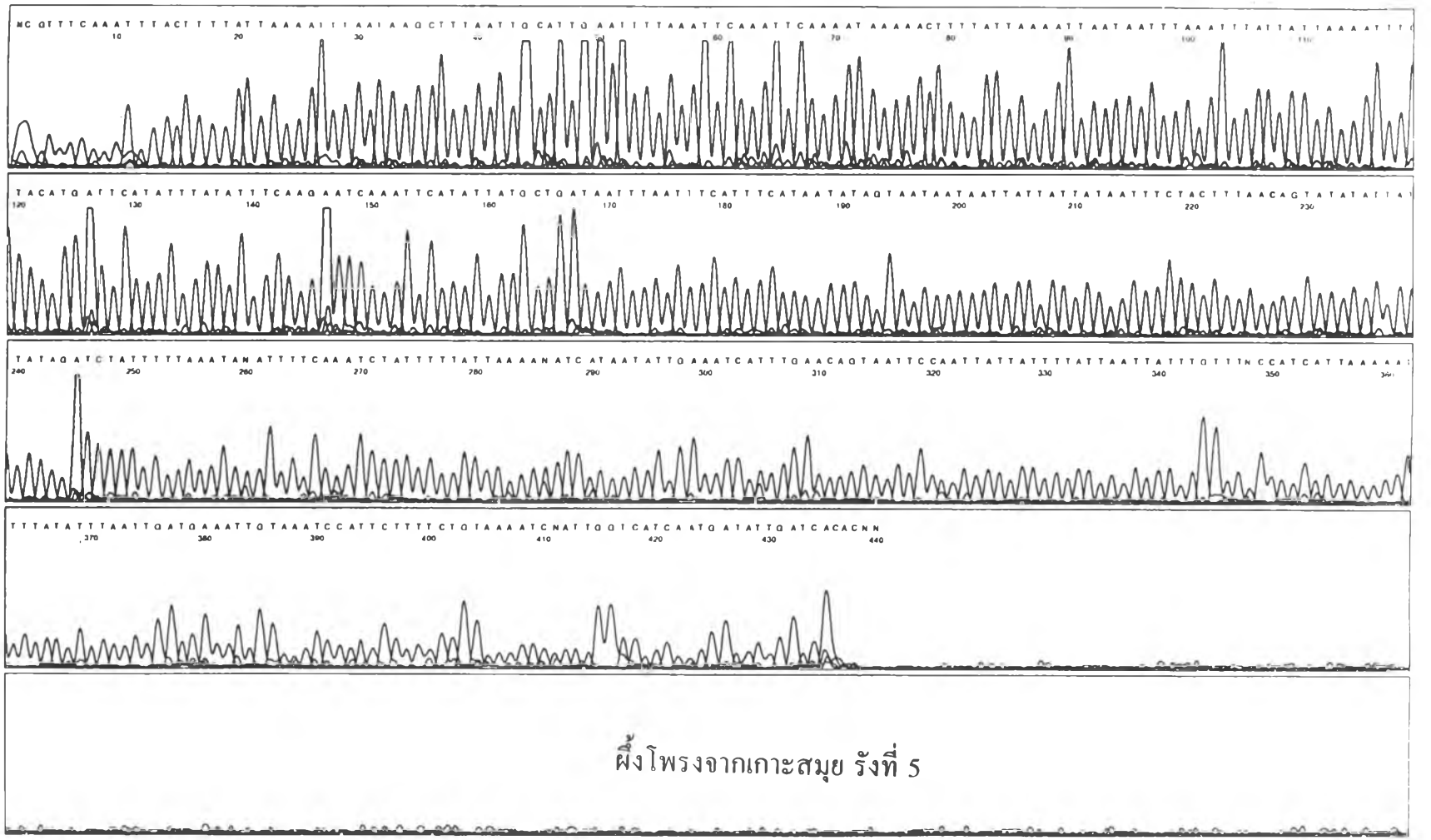
ผึ้งโพรงจากเกาะสมุย รังที่ 3

ภาคผนวกที่ 8 (ต่อ)



ผึ้งโพรงจากเกาะสมุย รังที่ 4

ภาคผนวกที่ 8 (ต่อ)



ผึ้งโพรงจากเกาะสมุย รังที่ 5

ภาคผนวกที่ 9 แผนที่ประเทศต่างๆ ที่นำผึ้งโพรงมาเปรียบเทียบลำดับเบส

ประวัติผู้เขียน

นางสาวลินดา บุหงาเรือง สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2536 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาสาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย