การใช้เทคนิค HAT-RAPD ในการระบุชนิดของหนอนตายหยากจากส่วนราก

Using HAT-RAPD technique for species identification of *Stemona* spp. roots

ณรีพร สุทธดุก ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา และ สิริพร โรจน์อารยานนท์*

Nareeporns Suttaduk, Srisulak Dheeranupattana, Siriphorn Rotarayanont*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand

**Corresponding author: siriphorn.biocmu@gmail.com*

บทคัดย่อ

รากของต้นหนอนตายหยากชนิด *Stemona curtisii* สามารถนำมาผลิตสารกำจัดศัตรูพืชได้เนื่องจากมีสารแอลคาลอยด์ชนิด stemocurtisine แต่การผลิตสารกำจัดศัตรูพืชในระดับอุตสาหกรรมพบว่ามีปัญหาในการจัดซื้อวัตถุดิบเพราะไม่สามารถแยกความแตกต่างของรากชนิด *S. curtisii* กับรากหนอนตายหยากชนิดอื่นได้ด้วยตาเปล่า ในการทดลองนี้จึงใช้เครื่องหมายโมเลกุลจากเทคนิค high annealing temperature random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) ในการจำแนกชนิดของต้นหนอนตายหยากจากส่วนราก โดยวิธีที่เหมาะสมสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากส่วนรากคือ วิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) เมื่อนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 20 ไพรเมอร์ พบว่ามี 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ B-01, B-05, B-07, N-13, N-18, O-10, OPAG 07, OPAG 14, OPAI 08 และ OPAJ 09 ที่แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *S. curtisii* แตกต่างจากหนอนตายหยากชนิดอื่น

ABSTRACT

Stemona curtisii root is currently used as herbal insecticide due to its production of alkaloids, specifically stemocurtisine. However, industrial production of insecticide from *S. curtisii* is problematic due to its high similarity to roots from other species. In this study, DNAs of *Stemona* spp. roots were extracted using Dellaporta *et al.* extraction method (1983) and analyzed by high annealing temperature random amplified polymorphic (HAT-RAPD) technique with 20 primers. Results showed that 10 primers, including B-01, B-05, B-07, N-13, N-18, O-10, OPAG 07, OPAG 14, OPAI 08 and OPAJ 09, produced DNA bands that can be used to distinguish *S. curtisii* from other species.

คำสำคัญ: หนอนตายหยาก, เครื่องหมายโมเลกุล, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, เทคนิค HAT-RAPD

Keywords: *Stemona* spp., molecular markers, DNA fingerprinting, HAT-RAPD technique

บทนำ

ประเทศไทยมีการใช้สารเคมีในภาคการเกษตรเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง เช่น สารเคมีปราบศัตรูพืช หรือปุ๋ยเคมี ทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม จึงได้ส่งเสริมการใช้สารสกัดจากธรรมชาติเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีศัตรูพืช เช่น ต้นหนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) ที่สามารถกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด เช่น หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก ด้วงหมัดผัก และด้วงงวงข้าวโพด (อริยาภรณ์ และคณะ, 2547) โดยสารออกฤทธิ์ที่ต้นหนอนตายหยากสร้างเป็นสารแอลคาลอยด์ (alkaloid) ได้หลายชนิด เช่น stemonine, stemonidine และ stemocurtisine (นิจศิริ และ พยอม, 2534) โดยพบว่าสาร stemocurtisine มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนได้ดีที่สุด (ดรุณลักษม์, 2544) และมีการศึกษาพบว่ารากของ *S. curtisii* มีสาร stemocurtisine อยู่มากที่สุด (Mungkornasawakul *et al*., 2003)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และกรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม ได้ร่วมกันพัฒนาการใช้สารสกัดจากรากต้นหนอนตายหยากทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช จนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีชื่อว่า “ไบโอเพส” (คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และคณะ, 2551) แต่ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมพบปัญหาการจัดซื้อวัตถุดิบ เนื่องจากไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างรากของ *S. curtisii* กับชนิดอื่นได้ด้วยตาเปล่า เนื่องจากลักษณะสัณฐานของต้นหนอนตายหยากแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกัน การจัดจำแนกต้องอาศัยนักอนุกรมวิธานที่มีความชำนาญโดยเฉพาะส่วนรากที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบ การตรวจสอบชนิดของรากด้วยเครื่องหมายโมเลกุลจึงเป็นทางออกสำหรับปัญหานี้

การตรวจสอบชนิดหรือสายพันธุ์ของพืชด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล เริ่มเป็นที่ยอมรับในทางการค้า เช่น การตรวจสอบการปลอมปนในข้าวหอมมะลิ 105 กับข้าวอื่น เช่น ข้าวหอมปทุมธานี 1 (สมวงษ์ และอภิชาติ, 2544) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกใช้เทคนิค high annealing temperature random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) (Anutalabhochai *et al*., 2000) ซึ่งเป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) แต่มีความแม่นยำสูงกว่าและสามารถทำซ้ำแล้วได้ผลเหมือนเดิม อีกทั้งมีขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อนและมีต้นทุนถูกที่สุดเมื่อเทียบกับเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลเทคนิคอื่นๆ เช่น เทคนิค restriction fragment length polymorphism หรือเทคนิค amplified fragment length polymorphism

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบชนิดของต้นหนอนตายหยากจากส่วนรากที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการสกัดสารกำจัดศัตรูพืช ที่สามารถระบุความแตกต่างระหว่างต้นหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii* กับต้นหนอนตายหยากชนิดอื่นได้

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างใบสดของต้นหนอนตายหยากที่ทราบชนิดแน่นอนจากแปลงรวบรวมพันธุ์ สถานีเกษตรแม่เหียะ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ *S. curtisii* จำนวน 2 ตัวอย่าง, *S. burkillii* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *S. tuberosa* จำนวน 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างรากแห้งจากโรงงานจำนวน 2 ตัวอย่าง กำหนดเป็น unknown 1 และ unknown 2

การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมดด้วยวิธีการของ Dellaporta *et al*. (1983) โดยล้างตัวอย่างให้สะอาด ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ บดตัวอย่างที่มีน้ำหนักประมาณ 200 มิลลิกรัม ในโกร่งพร้อมไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี extraction buffer (500 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris–HCl pH 8.0, 20% SDS 70 ไมโครลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นนำไปบ่มในอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำมาเติม 5M potassium acetate ปริมาตร 350 ไมโครลิตร เขย่าอย่างแรงแล้วแช่นำแข็งเพื่อช่วยตกตะกอนโปรตีน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อให้โปรตีนตกลงมาด้านล่าง ส่วนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเออยู่ในสารละลายด้านบน ดูดสารละลายด้านบนใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งแล้วเทสารละลายทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้ง จากนั้นนำมากำจัดอาร์เอ็นเอที่ปนเปื้อนอยู่ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตกตะกอนอีกครั้งด้วย 100% ethanol และ 3M sodium acetate (pH 5.2) และละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer ก่อนนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาปรับความเข้มข้นให้แต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างต้นหนอนตายหยากที่ทราบชนิดจากแปลงรวบรวมพันธุ์ จำนวน 5 ตัวอย่าง มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 4 mM $MgCl_2$, 5 µM primer (Table 1), *Taq* DNA polymerase 0.5 หน่วย

(Fermentus, California, USA) และ genomic DNA 40 นาโนกรัม นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermo cycler โดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ขั้นตอน initial melting step ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ, 35 รอบของ 3 ขั้นตอนย่อยที่ประกอบด้วย denaturation stage ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing stage ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส 30 วินาที extension stage ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ final extension step ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.8 เปอร์เซ็นต์ นำแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ทราบชนิดทั้ง 5 ตัวอย่างมาเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเกิดแถบดีเอ็นเอที่สามารถระบุความแตกต่างระหว่าง *S. curtisii* กับต้นหนอนตายหยากชนิดอื่น จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดจากรากแห้งที่ได้จากโรงงานมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้แล้ว

Table 1 Name and sequence of primers used in this study.

Name	Primer sequence (5′⟶3′)
B-01	GTT TCG CTC C
B-02	TGA TCC CTG G
B-03	CAT CCC CCT G
B-04	GGA CTG GAG T
B-05	TGC GCC CTT C
B-07	GGT GAC GCA G
B-20	GGA CCC TTA C
N-05	ACT GAA CGC C
N-13	AGC GTC ACT C
N-18	GGT GAG GTC A
O-01	GGC ACG TAA G
O-02	ACG TAG CGT C
O-03	CTG TTG CTA C
O-09	TCC CAC GCA A
O-10	TCA GAG CGC C
O-18	CTC GCT ATC C
OPAG-07	CAC AGA CCT G
OPAG-14	CTC TCG GCG A
OPAI-08	AAG CCC CCC A
OPAJ-09	ACG GCA CGC A

ผลการทดลองและวิจารณ์

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค HAT-RAPD

ในการทดลองครั้งนี้ ได้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากตัวอย่างต้นหนอนตายหยากที่ทราบชนิดแน่นอนแล้วจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *S. curtisii* ซึ่งเป็นหนอนตายหยากชนิดที่สามารถนำมาผลิตสารกำจัดศัตรูพืชได้ *S. burkillii* และ *S. tuberosa* จากนั้นนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างเหล่านี้ไปเปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างรากแห้งจากโรงงานทั้ง 2 ตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบว่าตัวอย่างจากโรงงานเป็นหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii* หรือไม่

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้อุณหภูมิในขั้น annealing stage ที่ 46 องศาเซลเซียส ทดสอบกับไพรเมอร์ HAT-RAPD จำนวน 20 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 10 ชนิด ที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ส่วนไพรเมอร์อีก 10 ชนิด ได้แก่ ไพรเมอร์ B-01, B-05, B-07, N-13, N-18, O-10, OPAG 07, OPAG 14, OPAI 08 และ OPAJ 09 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่สามารถระบุความแตกต่างระหว่างต้นหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii* กับต้นหนอนตายหยากชนิดอื่นได้ เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวไปทดสอบกับรากที่ได้จากโรงงาน พบว่าตัวอย่าง unknown 1 และ unknown 2 มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตรงกับตัวอย่างชนิด *S. tuberosa* และ *S. curtisii* ตามลำดับ (Figure 1 and 2) ทั้งนี้การปรากฏของแถบดีเอ็นเอเกิดจากการที่ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอแบบสุ่มทั่วทั้งจีโนม ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่างเกิดจากจำนวนของตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าเกาะไม่เหมือนกัน หรือมีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ไพรเมอร์เกาะหรือบริเวณที่อยู่ระหว่างตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์เกิดดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นมาหรือขาดหายไป (Micheli *et al*., 1994)

จากการทดสอบไพรเมอร์ 20 ชนิดแล้วพบว่ามี 10 ไพรเมอร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่สามารถระบุความแตกต่างระหว่างต้นหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii* กับตัวอย่างชนิดอื่นได้ ส่วนอีก 10 ไพรเมอร์ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอนั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของศรีสุลักษณ์ และคณะ (2547) ที่ได้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของต้นหนอนตายหยากจำนวน 9 ตัวอย่างด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่ม แต่ไม่

สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานของราก โดยกลุ่มที่ 1 มีต้นหนอนตายหยากชนิด *S. tuberosa*, *S. kerrii* และตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิด กลุ่มที่ 2 มีต้นหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii* และตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิด ทั้งนี้ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ไพรเมอร์บางตัวที่เหมือนกับงานของศรีสุลักษณ์และคณะ (2547) ได้แก่ B-01, B-02, B-03, B-04, B-05, B-07, B-20, N-05, N-13, N-18, O-01, O-02, O-09, O-10 และ O-18 แต่พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค HAT-RAPD มีจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่น้อยกว่าแต่มีความชัดเจนมากกว่าเทคนิค RAPD

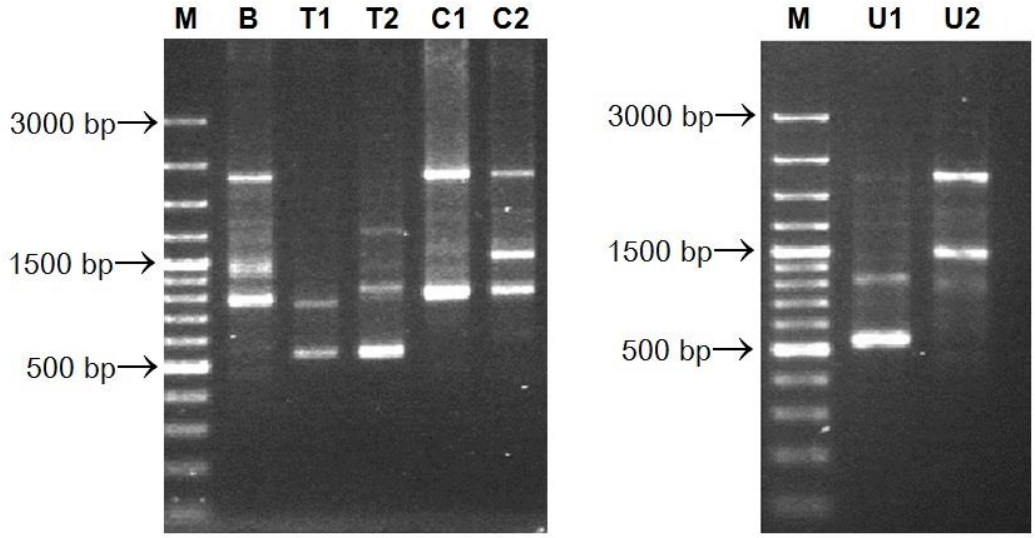

Figure 1 HAT-RAPD pattern using primer B-07 (M = GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, (Fermentus, California, USA); B = *S. burkillii*; T1 and T2 = *S. tuberosa*; C1 and C2 = *S. curtisii*; U1 = unknown 1; U2 = unknown 2).

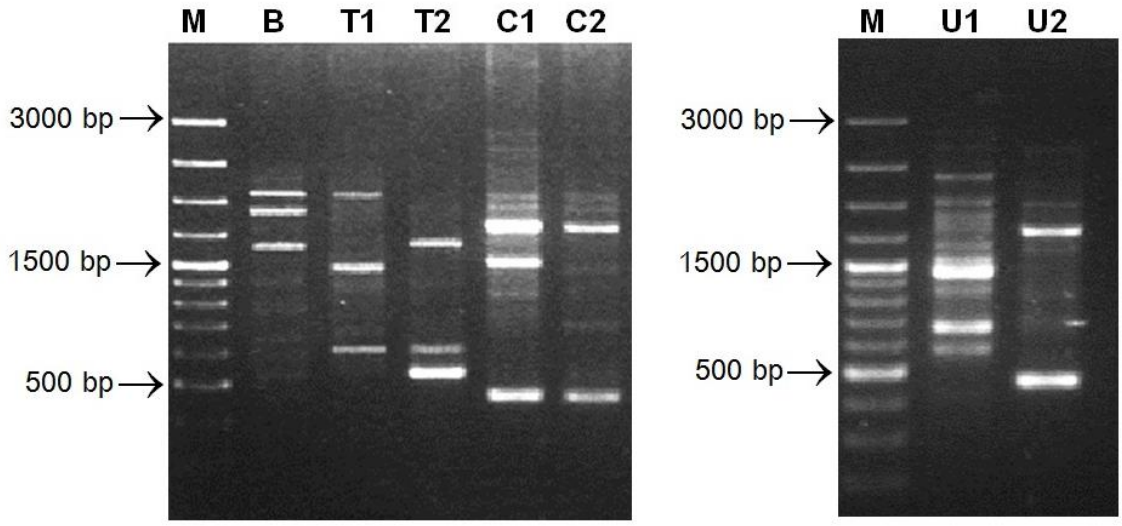

Figure 2 HAT-RAPD pattern using primer OPAG 14 (M = GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, (Fermentus, California, USA); B = *S. burkillii*; T1 and T2 = *S. tuberosa*; C1 and C2 = *S. curtisii*; U1 = unknown 1; U2 = unknown 2).

ในการวิจัยพบว่าตัวอย่างต้นหนอนตายหยากที่เป็นชนิดเดียวกันปรากฏแถบดีเอ็นเอบางส่วนแตกต่างกัน โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอของคู่ตัวอย่าง T1 และ T2 ที่เป็น *S. tuberose* และคู่ตัวอย่าง C1 และ C2 ที่เป็น *S. curtisii* โดยความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างต้นหนอนตายหยากที่เป็นชนิดเดียวกันเกิดจากความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าต้นหนอนตายหยากชนิด *S. curtisii* ในธรรมชาติมีหลายสายพันธุ์ และยังแสดงให้เห็นว่าเทคนิค HAT-RAPD สามารถจำแนกต้นหนอนตายหยากได้ถึงระดับสายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chundet *et al*. (2007) ที่พบว่าเทคนิค HAT-RAPD สามารถแยกความแตกต่างของลิ้นจี่ (*Litchi chinensis*) ลูกผสมได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนดอกผลคณะมหาวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และขอขอบคุณ รศ. ดร.อารยา จาติเสถียร สำหรับตัวอย่างหนอนตายหยากที่แปลงรวบรวมพันธุ์ สถานีเกษตรแม่เหียะ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม (2551) การพัฒนาการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการเกษตร รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ กรมส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ

ดรุณลักษม์ จันทยศ (2544) ผลของสารสกัดจากหนอนตายหยาก (*Stemona tuberosa* Lour.) ต่อหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) และหนอนกะทู้ผัก (*Spodoptera litura* F.) ในห้องปฏิบัติการ การค้นคว้าแบบอิสระเชิงวิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

นิจศิริ เรืองรังสี, พะยอม ตันติวัฒน์ (2534) พืชสมุนไพร สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา, อารยา จาติเสถียร, สิริพร แจ้งสุทธิวรวัฒน์, นฏา อารยะสกุล (2547) การจำแนกสายพันธุ์ต้นหนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) ด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง, อภิชาติ วรรณวิจิตร (2544) เทคโนโลยีดีเอ็นเอกับการควบคุมคุณภาพข้าว วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ 5: 123–126.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2552) เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อริยาภรณ์ พงษ์รัตน์, กาญจนา รุ่งรัชกานนท์, ศรีประไพ ธรรมแสง, วรงค์ นัยวินิจ, ภาคภูมิ สืบนุการณ์, อารี วังมณีรัตน์, นิธิมา สุทธิพันธ์ (2547) การศึกษาการผลิตและการขยายพันธุ์หนอนตายหยาก รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

Chundet R, Cutler RW, Tasanon M, Anuntalabhochai S (2007) Hybrid detection in lychee (*Litchee chinensis* Sonn.) cultivars using HAT-RAPD markers. Sci Asia 33: 307–311.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA minipreparation: version II. Plant Mol Biol Report 1: 19–21.

Micheli MR, Bova R, Pascale E, D'Ambrosio E (1994) Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. Nucleic Acids Res 22: 1921–1922.

Mungkornasawakul P, Pyne SG, Jatisatienr A, Supyen D, Lie W, Ung AT, Skelton BW, White AH (2003) Stemonacurtisine, the first pyrido [1,2-a] azapine Stemona alkaloid. J Nat Prod 66: 980–982.