

Thesis Title The Study on the Effects of Media
 Modification in Tissue Culture of Datura
metel L. on the Production of Tropane
 Alkaloids

Author Mr. Chavalit Sittisombut

Master of Pharmacy In Pharmacognosy

Examining Committee:

Professor Dr. Sasri	Punyarajun	Chairman
Assist. Prof. Dr. Pimchai	Apavatjirut	Member
Assist. Prof. Suwanna	Vejabhikul	Member
Assist. Prof. Virasak	Chuamanochan	Member

ABSTRACT

Scopolamine and atropine, therapeutically used as sedatives, antispasmodics and mydriatics, are the important tropane alkaloids present in Datura metel L. In this study media modification in tissue culture of D. metel L. has been attempted to find the effects on the production of scopolamine, atropine and total alkaloid content. Growth and water content of callus cultures were also investigated to find the correlation to the alkaloid production.

Tropane alkaloids could be produced in calli of cotyledon, hypocotyl and root of D. metel L. seedling, higher concentrations of alkaloids presented in hypocotyl and cotyledon-derived calli. Scopolamine production was higher than that of atropine.

Growth of hypocotyl-derived callus was more rapid in the

first two weeks and the production of alkaloids was increased when the growth became slower. High level of alkaloid production and the optimum period of harvesting the callus recommended was at the 4 weeks of age, when growth index was relatively high.

The combinations of low level (0 or 0.01%) of ornithine and high level (0.1%) of phenylalanine, the biosynthetic precursors tested, resulted in high alkaloid production. The water content of calli related with levels of phenylalanine added. Water contents decreased when higher levels (0.01 and 0.1%) of phenylalanine were supplemented.

Combinations of BAP and NAA resulted in higher alkaloid production. Increased levels of BAP enhanced the alkaloid production. The high total alkaloid content, 1.65%, was obtained from calli in the medium supplemented with 0.20 mg/l BAP and 0.10 mg/l NAA. Scopolamine contents were higher than atropine contents in most treatments.

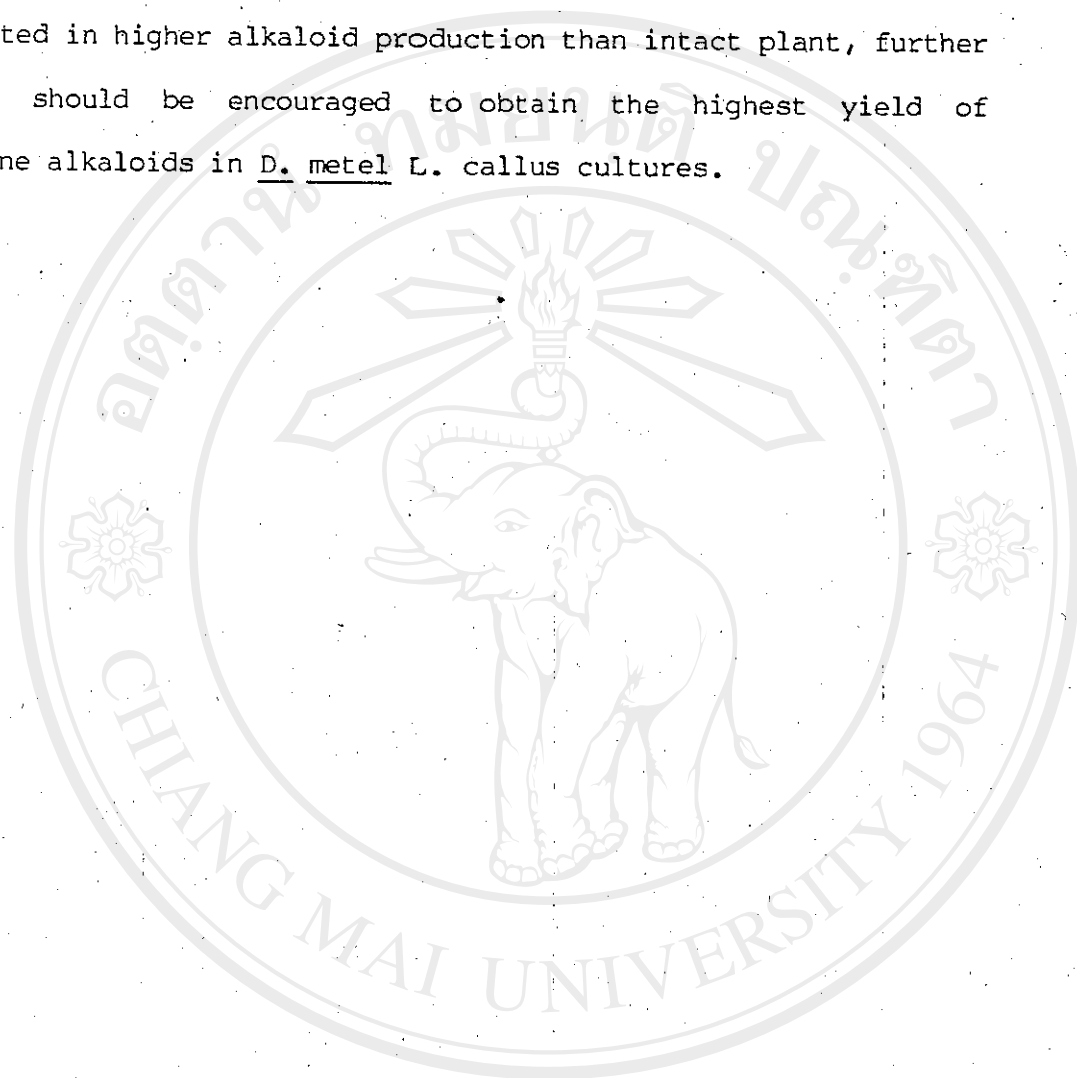
NH_4NO_3 has much more effect than KH_2PO_4 . Higher levels of NH_4NO_3 without KH_2PO_4 supplemented showed the higher alkaloid production. The highest total alkaloid content, 2.87%, was obtained from calli in the medium supplemented with 2,475 mg/l NH_4NO_3 without KH_2PO_4 . Atropine contents were also increased when levels of KH_2PO_4 added were decreased.

Sucrose, as carbohydrate source, was essential for callus growth and had effect on alkaloid production. The productions of alkaloids of the calli from media containing 3-7% sucrose were higher than those from media containing 0-1% sucrose.

Dimethylsulfoxide tested at higher levels (0.0001, 0.1 and 0.01%) increased alkaloid production. Higher levels of DMSO

should be investigated for higher alkaloid production.

As some treatments of tissue cultures in this study resulted in higher alkaloid production than intact plant, further works should be encouraged to obtain the highest yield of tropane alkaloids in D. metel L. callus cultures.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารที่ใช้เลี้ยง
เนื้อเยื่อลำไยต่อการผลิตโทรเนนอัลคาลอยด์

ชื่อผู้เขียน

นายชวลิต สิทธิสมบัติ

ภาควิชาศรัทธาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชเวช

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์:

ศ. ดร. สลี	ปีนยารชุน	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. พิมพ์ใจ	อภาวิชรุตม์	กรรมการ
ผศ. สุวรรณนา	เวชอภิกุล	กรรมการ
ผศ. วีรศักดิ์	เชื้อมโนชาญ	กรรมการ

บทคัดย่อ

สโคโพลามีน และอะโทรปีน ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์ทางยาใช้เป็นยาระงับประสาท, ยาแก้ปวดเกร็ง และขยายหลอดลม เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มโทรเนนอัลคาลอยด์ซึ่งพบได้ในพืชพวกลำไย วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงอาหารที่ใช้เลี้ยงเนื้อเยื่อลำไยว่าจะมีผลต่อการสร้างสโคโพลามีน, อะโทรปีน และปริมาณอัลคาลอยด์ทั้งหมดหรือไม่ และการศึกษาการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อว่าจะมีความสัมพันธ์กับอัลคาลอยด์ที่สร้างขึ้นหรือไม่

โทรเนนอัลคาลอยด์สามารถผลิตขึ้นในแคลลัสที่มาจากส่วนของใบเลี้ยง, ส่วนต้นใต้ใบเลี้ยงและส่วนรากของต้นอ่อนลำไย ปริมาณอัลคาลอยด์พบได้สูงในแคลลัสของส่วนต้นใต้ใบเลี้ยง และใบเลี้ยง ปริมาณสโคโพลามีนพบสูงกว่าอะโทรปีน

แคลลัสจากส่วนต้นใต้ใบเลี้ยงมีการเจริญรวดเร็วใน 2 สัปดาห์แรกและขณะที่การเจริญช้าลงพบว่าการสร้างอัลคาลอยด์จะสูงขึ้น ช่วงเวลาที่มีการสร้างอัลคาลอยด์สูงและเหมาะสมในการเก็บแคลลัสที่เลี้ยงคือขณะที่เนื้อเยื่อแคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ซึ่งเป็นขณะที่การเจริญค่อนข้างสูง

เมื่อใช้สารเริ่มต้นชีวสังเคราะห์ของ ไทรเบนอัลคาลอยด์ เป็นออร์นิตินในระดับต่ำ (0 หรือ 0.01%) และฟีนอละลานีนในระดับสูง (0.1%) ทำให้มีการสร้างอัลคาลอยด์สูง ปริมาณน้ำในแคลลัสส์ที่มีความสัมพันธ์กับระดับของฟีนอละลานีนที่เติมในอาหาร พบว่าปริมาณ น้ำในแคลลัสส์จะลดลงเมื่อระดับฟีนอละลานีนสูงขึ้น (0.01 และ 0.1%)

อาหารเลี้ยงเชื้อเยื่อซึ่งมีสารบีเอพี (BAP) และสารเอ็นเอเอ (NAA) ทำให้ การผลิตอัลคาลอยด์สูงขึ้น เมื่อระดับของสารบีเอพีสูงขึ้นจะเพิ่มการสร้างอัลคาลอยด์ได้มากขึ้น เมื่อใช้สารบีเอพี 0.2 มิลลิกรัม/ลิตรร่วมกับสารเอ็นเอเอ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร จะทำให้ มีการผลิตอัลคาลอยด์สูง 1.65% ส่วนใหญ่การสร้างสโคโพลามีน จะสูงกว่าอะโทรพีน

แอมโมเนียในเตตรามีผลมากกว่า โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการสร้าง อัลคาลอยด์ในแคลลัสส์ที่เลี้ยง ในอาหารที่ไม่มีโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเมื่อระดับของ แอมโมเนียในเตตรตในอาหารสูงขึ้นพบว่าการสร้างอัลคาลอยด์สูงขึ้น การผลิตอัลคาลอยด์ สูงสุดเป็น 2.87% ในแคลลัสส์ที่เลี้ยงบนอาหารซึ่งเติมแอมโมเนียในเตตรต 2,475 มิลลิกรัม /ลิตร แต่ไม่มีโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาณอะโทรพีนสูงขึ้น เมื่อระดับของ โปตัส เซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารลดลง

ซูโครสซึ่งเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตมีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงแคลลัสส์และ มี ผลต่อการผลิตอัลคาลอยด์ พบว่าการผลิตอัลคาลอยด์ของแคลลัสส์ที่เลี้ยงในอาหารซึ่งมีซูโครส 3-7% สูงกว่าการผลิตอัลคาลอยด์ของแคลลัสส์ที่เลี้ยงในอาหารซึ่งมีซูโครส 0-1%

สารไตรเมทิลซิลฟอกไซด์ เมื่อใช้ในระดับสูง (0.001, 0.1 และ 0.01%) พบว่าเพิ่มการสร้างอัลคาลอยด์ อย่างไรก็ตามควรจะศึกษาการใช้สารนี้ในระดับที่สูงขึ้นว่าจะ ทำให้มีการผลิตอัลคาลอยด์สูงขึ้นหรือไม่

จากงานวิจัยนี้ บางการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อลำโพงสามารถสร้างอัลคาลอยด์ สูงกว่าในพืชที่ปลูก ดังนั้นควรที่จะมีการศึกษามากกว่านี้ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการ เพาะเลี้ยงแคลลัสส์ลำโพง ให้เป็นแหล่งผลิตไทรเบนอัลคาลอยด์ได้สูงสุด