Thesis Title Secondary Compound Production from Root Cultures of *Stemona* spp.

Author Mr. Kittisak Chotikadachanarong

Degree Doctor of Philosophy (Biology)

Thesis Advisory Committee
Asst. Prof. Dr. Srisulak Dheeranupattana Advisor
Assoc. Prof. Dr. Araya Jatisatienr Co-advisor
Dr. Pitchaya Mungkornasawakul Co-advisor

ABSTRACT

The time profiles for the production of *Stemona* alkaloid (stemocurtisine, stemocurtisinol and oxyprotostemonine, the important insecticidal alkaloids) in root cultures were determined. Roots of *Stemona curtisii* Hook. f. (Thai vernacular, Non Tai Yak, Family Stemonaceae) were cultured on semi-solid MS medium containing 1 mg/L NAA for 24 weeks and harvested every 4 weeks. Root and medium extracts were analyzed quantitatively by HPLC. The maximum biomass (411 mg dw) was obtained at the end of linear growth phase at week 16, which was also the peak time of oxyprotostemonine accumulation (2,713.6 µg/g dw, 5 folds higher than of intact root) in the root extract. The highest accumulation amount of stemocurtisinol (366 µg/g dw, 50% higher than that of intact root) and stemocurtisine (24 µg/g dw) content were detected at week 8 and week 12, respectively. However, at week 20 oxyprotostemonine, stemocurtisine and stemocurtisinol were secreted into the medium at 1,166, 11 and 17 µg/g dw, respectively.

The time profile of root growth and 1′,2′-didehydrostemofoline accumulation from root cultures of *Stemona* sp. showed that the highest 1′,2′-didehydrostemofoline production (31.04 mg/g dw) was observed at the end of stationary phase (16th week),

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

which also corresponded to the maximum root dry weight (255 mg dw). However, it was found that intact root could produce this alkaloid at 47.46 mg/g dw (53% higher than that of cultured root at 16 weeks). Therefore, the effects of precursors, elicitors and culture condition will not be investigated for this species.

The influence of precursors, elicitors and some culture conditions on the production of *Stemona* alkaloids were then studied. Roots of *S. curtisii* were cultured on semi-solid MS medium supplemented with 1 mg/L NAA (control) and/or containing different concentrations of precursors (sodium acetate, sucrose and tyrosine), elicitors (jasmonates, salicylates, yeast extract and chitosan) under various culture conditions (temperature, illumination and pH of the medium), and harvested at week 16. The highest total oxyprotostemonine (7,192±138.2 µg/g dw, 13 folds higher than intact root) and stemocurtisine (39±0.4 µg/g dw) contents were obtained in cultures treated with 500 mg/L salicylic acid. However, the highest content of stemocurtisinol was 1,333±15 µg/g dw (5 folds higher than of intact root) from root treated with 20 mg/L tyrosine. Our findings indicate that the application of precursors or elicitors can enhance the capacity of *S. curtisii* root cultures to produce alkaloid material with insecticidal activities.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การผลิตสารประกอบทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงรากของหนอนตายหยากชนิดต่างๆ

ผู้เขียน นาย กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ. ดร. อารยา จาติเสถียร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ดร. พิชญา มังกรอัศวกุล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงรากของหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook. f) เพื่อศึกษาช่วงเวลาในการผลิตสารอัลคาลอยด์ ได้แก่ oxyprotostemonine stemocurtisine และ stemocurtisinol ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช โดยการเลี้ยงชิ้นส่วนรากบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก/ล เป็นเวลา 24 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างรากทุกๆ 4 สัปดาห์ สกัดสารจากรากและอาหารเพาะเลี้ยงแล้วนำไปวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC พบว่ารากมีการเจริญเติบโตสูงสุด (411 มก น้ำหนักแห้ง) หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์ซึ่งเป็นช่วงปลายของระยะ linear phase อีกทั้งยังเป็นช่วงเวลาที่รากมีการสร้างสาร oxyprotostemonine สูงที่สุด 2,713.6 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (มากกว่าปริมาณที่พบในรากธรรมชาติ 5 เท่า) ส่วนการสร้างสาร stemocurtisinol 366 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (มากกว่าปริมาณที่พบในรากธรรมชาติ 50%) และ stemocurtisine 24 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง สะสมในรากปริมาณสูงที่สุด พบในสัปดาห์ที่ 8 และสัปดาห์ที่ 12 ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่าในสัปดาห์ที่ 20 มีการปล่อยสาร oxyprotostemonine stemocurtisine และ stemocurtisinol ลงในอาหารเพาะเลี้ยงปริมาณ 1,166, 11 และ 17 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

การศึกษาช่วงระยะเวลาการเติบโตของราก และการผลิตสาร 1′,2′-didehydrostemofoline จากการเพาะเลี้ยงรากของ *Stemona* sp. พบว่ารากมีการผลิตสาร 1′,2′-didehydrostemofoline ปริมาณสูงที่สุด 31.04 มก/ก น้ำหนักแห้ง ในสัปดาห์ที่ 16 ซึ่งเป็นช่วงปลายของระยะ stationary

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

phase และมีปริมาณน้ำหนักแห้งของรากสูงที่สุดคือ 255 มก อย่างไรก็ตาม พบว่ารากในธรรมชาติมีการผลิตสาร 1′,2′-didehydrostemofoline ปริมาณ 47.46 มก/ก น้ำหนักแห้ง (สูงกว่าปริมาณสารในรากจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์ 53%) ดังนั้นผลของสารตั้งต้น สารกระตุ้น และสภาวะในการเพาะเลี้ยงจึงไม่ได้นำมาศึกษาในพืชชนิดนี้

จากนั้นจึงศึกษาผลของสารตั้งต้น สารกระตุ้น หรือ สภาวะในการเพาะเลี้ยงต่อการสร้างสารอัลคาลอยด์ดังกล่าวโดยเพาะเลี้ยงรากของ *S. curtisii* บนอาหารวุ้นที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มก/ล (ชุดควบคุม) และเติมสารตั้งต้น ได้แก่ sodium acetate, sucrose และ tyrosine หรือสารกระตุ้น ได้แก่ jasmonates, salicylates, yeast extract และ chitosan ความเข้มข้นต่างๆ หรือ เพาะเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน เช่น อุณหภูมิ การให้แสง และค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 16 สัปดาห์ พบว่าชุดการทดลองที่เติม salicylic acid ความเข้มข้น 500 มก/ล สารจากราก และอาหารมีปริมาณรวมทั้งหมดของ oxyprotostemonine (7,192 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งมากกว่าปริมาณในรากธรรมชาติ 13 เท่า) และ stemocurtisine (39 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หรือมากกว่าปริมาณในชุดควบคุม 39 เท่า) สูงที่สุด อย่างไรก็ตามในชุดการทดลองที่เติม tyrosine ความเข้มข้น 20 มก/ล พบว่าปริมาณของ stemocurtisinol สูงสุดคือ 1,333 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (มากกว่าปริมาณในรากธรรมชาติ 5 เท่า) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงรากของหนอนตายหยากร่วมกับการเติมสารตั้งต้น หรือสารกระตุ้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตสารอัลคาลอยด์ เพื่อใช้เป็นสารในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved