

การเลี้ยงปลายยอดและปลายรากหนอนตายหยาก (*Stemona curtisii* Hook.f.) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารวุ้น Murashige and Skoog (MS) ที่เติม 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) หรือ thidiazuron (TDZ) หรือ benzyladenine purine (BAP) ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1.0 mg/l ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนปลายยอดเท่านั้นที่เกิดแคลลัส โดยอาหารวุ้น MS ที่เติม 2,4-D 1.0 mg/l สามารถชักนำปลายยอดให้เกิด friable callus สูงสุด 64.28% ขณะที่อาหารวุ้น MS ที่เติม BAP 1.0 mg/l หรือ TDZ 0.1 - 0.7 mg/l สามารถชักนำปลายยอดให้เกิด compact callus สูงสุด 87.50%

การวิเคราะห์หาสารทุติยภูมิจากใบและรากหนอนตายหยากที่ได้จากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ รวมทั้งแคลลัส ด้วย High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) โดยใช้ dichloromethane : methanol : aqueous ammonia (95 : 5 : 1) เป็น mobile phase พบว่าในใบและรากจากธรรมชาติเท่านั้นที่มี stemocurtisine 0.0451 และ 0.0714 mg/g (DW) ตามลำดับ ส่วนใบ ราก และแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจะไม่พบ stemocurtisine แต่พบสาร unknown ที่ค่า R_f 0.05 - 0.06 เหมือนกับที่พบในใบและรากจากธรรมชาติ ซึ่งคาดว่าเป็นสาร alkaloid เนื่องจากให้ผลบวกกับการทดสอบด้วย Dragendorff's reagent

เมื่อนำต้นอ่อนอายุ 8 สัปดาห์ที่ชักนำให้เกิดรากแล้วย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่เติม salicylic acid (SA) 100 และ 200 μ M เป็นเวลา 28 วัน พบว่า SA ไม่มีผลต่อการสะสม stemocurtisine ในรากและอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ส่วนการศึกษาผลของ methyl jasmonate (MeJa) ต่อการผลิตสารทุติยภูมิใน friable callus พบว่า MeJa ไม่มีผลต่อการสะสม stemocurtisine ใน friable callus และอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง แต่พบว่ามีผลกระทบทำให้มีการผลิตและหลั่งสารทุติยภูมิชนิดอื่นลงสู่อาหารเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่า MeJa 100 μ M ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ friable callus ที่เพาะเลี้ยง โดยดูจากค่า biomass accumulation ที่สูงสุด 15.16 g (FW)/l ขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่เติม MeJa มีค่า biomass accumulation สูงสุด 12.76 g (FW)/l

การเพาะเลี้ยง friable callus ใน stirred tank bioreactor ที่เติม MeJa 100 μ M ภายใต้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 7 วัน พบว่าไม่มีการสะสมของ stemocurtisine ในแคลลัสและอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

Shoot and root tips of *Stemona curtisii* Hook.f. plantlets from *in vitro* plantlets were cultured on Murashige and Skoog (MS) agar media supplemented with 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 and 1.0 mg/l of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) or thidiazuron (TDZ) or benzyladenine purine (BAP) at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, with 16 hours per day illumination for 8 weeks. It was found that callus formation was induced from the shoot tips explants only. The MS agar medium containing 1.0 mg/l 2,4-D induced the highest friable callus production at 64.28%. While, the MS medium containing 1.0 mg/l BAP or 0.1 - 0.7 mg/l TDZ induced the highest compact callus production at 87.50%.

Analysis for secondary compounds in natural leaves and roots, *in vitro* shoots and roots as well as the calli with High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) using dichloromethane : methanol : ammonia (95:5:1) as the mobile phase revealed that stemocurtisine was present in the natural leaves and roots at 0.0451 and 0.0714 mg/g DW, respectively but not in the cultured leaves, roots and callus. However, an unknown secondary compound at R_f 0.05 - 0.06 was detected in the *in vitro* explants similar to that found in natural leaves and roots. This unknown might be alkaloid because it reacted positively with Dragendorff's reagent.

The *in vitro* rooted - plantlets cultured for 8 weeks were transferred to the MS liquid medium supplemented with 100 and 200 μM salicylic acid (SA) for 28 days. It was found that SA had no effect on the stemocurtisine accumulation in cultured roots and cultured medium. The study on the effect of methyl jasmonate (MeJa) on the production of secondary compound in the friable callus indicated that MeJa did not stimulate the stemocurtisine accumulation in the callus and cultured medium, but stimulated the production and secretion of other secondary metabolite into the medium. Moreover, 100 μM MeJa did not inhibit callus growth as seen from the highest biomass accumulation of 15.16 gFW/l. While, the control without MeJa, the highest biomass accumulation was 12.76 gFW/l.

Friable callus cultured in stirred tank bioreactor supplemented with 100 μM MeJa at 25°C , with 16 hours per day illumination for 7 days showed that there was no stemocurtisine accumulation in the callus and cultured-medium.