ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E41010

SECONDARY COMPOUND PRODUCTION FROM ROOT CULTURES OF *Stemona* spp.

KITTISAK CHOTIKADACHANARONG

DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
JULY 2011

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E41010

SECONDARY COMPOUND PRODUCTION FROM ROOT CULTURES OF *Stemona* spp.

KITTISAK CHOTIKADACHANARONG

THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF THAILAND
RESEARCH LIBRARY

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOLOGY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
JULY 2011

SECONDARY COMPOUND PRODUCTION FROM ROOT CULTURES OF *Stemona* spp.

KITTISAK CHOTIKADACHANARONG

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOLOGY

EXAMINING COMMITTEE

.....CHAIRPERSON
Asst. Prof. Dr. Sunanta Wangkarn

.....MEMBER
Prof. Dr. Stephen G. Pyne

.....MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Araya Jatisatienr

.....MEMBER
Asst. Prof. Dr. Srisulak Dheeranupattana

.....MEMBER
Dr. Pitchaya Mungkornasawakul

THESIS ADVISORY COMMITTEE

.....ADVISOR
Asst. Prof. Dr. Srisulak Dheeranupattana

.....CO-ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Araya Jatisatienr

..... CO-ADVISOR
Dr. Pitchaya Mungkornasawakul

19 July 2011

© Copyright by Chiang Mai University

Acknowledgements

I would like to thank the Office of the Higher Education Commission, Thailand for supporting my grant funding under the program Strategic Scholarships for Frontier Research Network for the Ph.D. Program Thai Doctoral degree for this research. I thank my advisor, Asst. Prof. Dr. Srisulak Dheeranupattana and my co-advisor, Assoc. Prof. Dr. Araya Jatisatienr and Dr. Pitchaya Mungkornasawakul for clarifying several points in my research.

I also would like to express my gratitude to Professor Stephen G. Pyne (Department of Chemistry, University of Wollongong, Australia), Dr. Alison Ung (Department of Chemistry and Forensic Science, University of Technology, Australia) and Dr. Sunanta Wangkarn (Chemistry Department, Faculty of Science, Chiang Mai University) for their valuable help and advice during the experiments.

I appreciate the assistance from all personnel and faculty members for their assistance in using the equipment at the Biology and Chemistry Departments, Faculty of Science, Chiang Mai University.

I am thankful to the Human Resource Development Scholarship, Chiang Mai Rajabhat University, Thailand for their financial supported.

Finally, I would like to dedicate this research to my parents for all of their supports throughout my life.

Kittisak Chotikadachararong

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

E41010

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),

E41010

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.

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

E41010

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

E-41015

phase และมีปริมาณน้ำหนักแห้งของรากสูงที่สุดคือ 255 มก อย่างไรก็ตาม พบว่าราก[illegible] การผลิตสาร 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

Table of Contents

	Page
Acknowledgements	iii
Abstract (English)	iv
Abstract (Thai)	vi
List of Tables	xi
List of Figures	xii
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Principles, Theory, Rationale and/or Hypotheses	1
1.2 Research Objectives	2
Chapter 2 Literature Review	3
2.1 Delimitation and morphological characteristics of *Stemona* spp.	3
2.2 Bioactive of *Stemona* alkaloids	6
2.3 Micropropagation of *Stemona* spp.	7
2.4 Plant tissue cultures and secondary product compounds	8
2.5 Secondary metabolite production using root cultures	11
2.6 Secondary metabolite of production enhancement through elicitation	12
2.7 Enhanced secondary metabolite production through precursor feeding	21
2.8 Enhanced secondary metabolite production through culture conditions	23
Chapter 3 Materials and Methods	25
3.1 Secondary compound production from root cultures of *Stemona curtisii*	25
3.1.1 Plant materials and multiple shoot induction	25
3.1.2 Time profile study of alkaloid formation in root culture	25
3.1.3 Effects of elicitors on growth and *Stemona* alkaloids production in root cultures	26
3.1.4 Effects of precursors on growth and *Stemona* alkaloids production in root cultures	26

3.1.4 Effects of precursors on growth and *Stemona* alkaloids production in root cultures 26
3.1.5 Effects of culture condition on growth and *Stemona* alkaloids production in root cultures 27
3.1.6 Root fresh and dry weight (dw) determination 27
3.1.7 Alkaloid extraction 27
3.1.8 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis of alkaloids from the root and the exudates 28
3.1.9 Limitation of the analysis 30
3.1.10 Statistical analysis 30
3.2 Secondary compound production from root cultures of *Stemona* sp. 32
3.2.1 Plant materials and culture medium 32
3.2.2 Time profile study of 1′,2′-didehydrostemofoline production in root cultures of *Stemona* sp. 32
3.2.3 Root extraction method and HPLC condition 32
3.2.4 Statistical analysis 34

Chapter 4 Results and Discussion 35
4.1 Secondary compound production from root cultures of *Stemona curtisii* 35
4.1.1 Time profile study of alkaloid formation in root culture 35
4.1.2 Effects of elicitors on growth and *Stemona* alkaloids production in root cultures 40
4.1.3 Effects of precursors on growth and *Stemona* alkaloids production in root cultures 58
4.1.4 Effects of culture condition on root growth and *Stemona* alkaloid production 67
4.2 Time profile study of 1′,2′-didehydrostemofoline production in root cultures of *Stemona* sp. 76

Chapter 5 Conclusions 78

References 84

Curriculum Vitae 96

List of Tables

Table	Page
3.1 Concentration of oxyprotostemonine, stemocurtisine and stemocurtisinol standards versus HPLC peak areas.	31
3.2 Concentration 1′,2′-didehydrostemofoline standrad versus HPLC peak area	34
4.1 Root growth and alkaloids production from root cultures in semisolid cultures medium.	39
4.2 Influence of elicitor on root growth and alkaloid content in root and cultures media of *S. curtisii*.	55
4.3 Influence of precursors and culture conditions on the alkaloid content in root and cultures media of *S. curtisii*.	72
4.4 Time profile of 1′,2′-didehydrostemofoline production	77

List of Figures

Figure	Page
2.1 *Stemona curtisii* Hook. F.	4
2.2 Unidentified *Stemona* sp.	5
2.3 Chemical structures of three alkaloids	6
2.4 The chemical structure of 1', 2'-didehydrostemofoline	7
3.1 Calibration curves of oxyprotostemonine, stemocurtisine and stemocurtisinol standards.	29
3.2 Chromatogram of a standards mixtures of oxyprotostemonine, stemocurtisine and stemocurtisinol.	30
3.3 Calibration curve of a standard 1',2'-didehydrostemofoline	33
3.4 Chromatogram of a standard 1',2'-didehydrostemofoline	34
4.1 Characteristics of root cultures semisolid cultures medium for 16 weeks.	37
4.2 Root growth and alkaloid content of root cultures in semisolid medium.	38
4.3 The effects of salicylic acid on root growth.	43
4.4 The effects of salicylic acid on oxyprotostemonine production.	43
4.5 The effects of salicylic acid on stemocurtisine production.	44
4.6 The effects of salicylic acid on stemocurtisinol production.	44
4.7 The effects of methyl jasmonate on root growth	47
4.8 The effects of methyl jasmonate on oxyprotostemonine production.	47
4.9 The effects of methyl jasmonate on stemocurtisine production.	48
4.10 The effects of methyl jasmonate on stemocurtisinol production.	48
4.11 The effects of yeast extract on root growth	49
4.12 The effects of yeast extract on oxyprotostemonine production.	50
4.13 The effects of yeast extract on stemocurtisine production.	50
4.14 The effects of yeast extract on stemocurtisinol production.	51
4.15 The effects of chitosan on root growth	52
4.16 The effects of chitosan on oxyprotostemonine production.	52

4.17 The effects of chitosan on stemocurtisine production. 53
4.18 The effects of chitosan on stemocurtisinol production. 53
4.19 Effects of elicitors on root growth 54
4.20 Effects of elicitors on cultured roots. 57
4.21 Effects of sucrose on root growth. 59
4.22 Effects of sucrose on oxyprotostemonine production. 60
4.23 Effects of sucrose on stemocurtisine production. 61
4.24 Effects of sucrose on stemocurtisinol production. 61
4.25 Effects of sodium acetate on root growth 62
4.26 Effects of sodium acetate on oxyprotostemonine production. 63
4.27 Effects of sodium acetate on stemocurtisine production. 63
4.28 Effects of sodium acetate on stemocurtisinol production. 64
4.29 Effects of tyrosine on root growth 65
4.30 Effects of tyrosine on oxyprotostemonine production. 65
4.31 Effects of tyrosine on stemocurtisine production. 66
4.32 Effects of tyrosine on stemocurtisinol production. 66
4.33 Effects of culture condition on root growth 68
4.34 Effects of culture condition on oxyprotostemonine production. 69
4.35 Effects of culture condition on stemocurtisine production. 69
4.36 Effects of culture condition on stemocurtisinol production. 70
4.37 Effects of precursors and culture conditions on root growth 70
4.38 Effects of precursors on cultured roots. 74
4.39 Effects of culture conditions on cultured roots. 75
4.40 Time profile of root growth and 1′,2′-didehydrostemofoline production from *Stemona* sp. root cultures 77
5.1 Effects of elicitors, precursors and culture condition on root growth 80
5.2 Effects of elicitors, precursors and culture condition on oxyprotostemonine production 81
5.3 Effects of elicitors, precursors and culture condition on stemocurtisine production 82
5.4 Effects of elicitors, precursors and culture condition on stemocurtisinol production 83