Thesis Title	*In Vitro* Culture, Chemical Composition Profile and Biological Activities of *Paris polyphylla* var. *chinensis* (Franch.) Hara
Author	Mr. Yuenyad Teerawatsakul
Degree	Doctor of Philosophy (Biology)
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Srisulak Dheeranupattana Advisor Assoc. Prof. Dr. Nisit Kittipongpatana Co-advisor Assoc. Prof. Dr. Nuttha Potapohn Co-advisor

ABSTRACT

Bioactive compounds from rhizome of *Paris polyphylla* var. *chinensis* (PPC) have been reported to have many pharmaceutical activities such as antitumor, anticancer and hemostatic. However, PPC had become a severe declined in population due to deforestation and overharvesting. The present research aimed to determine suitable conditions for *in vitro* culture of PPC, examine its chemical constituents, and test its bioactive properties.

In vitro culture of PPC in the present research was conducted on various plant parts including seed, pseudostem, and rhizome. In the investigation on PPC seed, after treated with 30 % Clorox disinfectant solution, coat was removed from the seeds which subsequently were cultured on E-20, MS, Gamborg B5, and water media, at 15 ˚C in dark condition. The decoated PPC seeds cultured on water had 100 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

germination rate within 15 months. Culturing on the other three media could not induce the germination of the decoated seeds at all. Other regulating factors like temperature and GA_3 were thus examined to determine their effect in breaking seed dormancy of PPC. For the study on the effect of temperature, PPC seeds after disinfectant treatment and coat removal were cultured on water at the temperatures of 5, 10, 12, 14, 16 and 18 ˚C. It was found that under 14 and 16°C conditions, 100 % germination could be attained in 15 months. The experiment on treatments by alternate cold and warm temperature regimes, 4˚C and 22 ˚C with 4 replicas, provided the result that PPC seeds failed to germinate. The study on the effect of GA_3 at 0, 5, 10, 15, 20 mg/l concentrations in breaking PPC seed dormancy also found no success in seed germination. Thus, it could be concluded that PPC seed was indeed characterized as having very deep physiological dormancy and GA_3 could not break the dormancy.

In vitro culture of PPC rhizome shoot tip was limited by bacterial contamination in normal tissue culture laboratory. Therefore, environmental factors such as temperature were studied on the propagation of shoot tip explants of PPC in MS free hormone medium. They were cultured in a gradient incubator at 5 to 18 °C for 45 days. It was found that temperature is a crucial factor controlling *in vitro* culture of PPC, and the temperatures between 14 to 16 °C were better than other temperature treatments in controlling endophytic bacteria and PPC growth. The shoot tip explants cultured at this range of temperature grow up to a stem of 7.5 cm length. At a temperature lower than 14 °C, the shoot tip explants could not grow. At the temperature higher than 18 °C, the shoot tip explants did not grow because the explants were contaminated by endophytic bacteria. It could be concluded that the temperature between 14 to 16 °C was the suitable culturing condition for shoot tip

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

culture of PPC. The effects of BA concentrations were studied and it was found that PPC shoot tip cultured at temperature 15 ℃ on MS medium supplemented with BA 5 mg/l and PPM 2 ml/l had multiplication rate at 1 : 1.2 and highest height at 7.0 cm over 90 days. And adenine sulfate at all concentrations had no effect in PPC shoot tip multiplication. PPC *in vitro* microrhizome induction was studied by increasing sucrose concentrations from 0 – 120 g/l and no effect was found to induce microrhizome no significant difference in diameter of shoot. Also in *in vitro* microrhizome induction various NAA concentrations appeared to have no effect and there existed no significant difference in diameter of PPC shoots. It has been concluded that PPC seed embryo rescue is a appropriate method for propagation and could break the dormancy from 24 – 36 months to 15 month with 100% germination rate.

Chemical constituent study by thin-layer chromatography (TLC) revealed presences of steroids and alkaloids from the dichloromethane crude extract (DiCE) of PPC, while methanol crude extract (MCE) afforded saponins, flavonoids and alkaloids. The evaluation of antioxidant activity by DPPH scavenging assay exhibited the highest EC_{50} value at 3.46$\pm$1.23 μmol TE/g from the DiCE of rhizomes collected from Mae-Rim district. MCE of rhizomes from Mae-rim district exhibited the best IC_{50} of cytotoxic MTT assay against HL-60 cell line at 0.77$\pm$0.1 μg/ml. These values suggested potential pharmaceutical application of PPC extracts.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ รูปแบบองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพของตีนฮุ้งดอย (*Paris polyphylla* var. *chinensis* (Franch.) Hara
ผู้เขียน	นายยืนหยัด ธีระวัฒน์สกุล
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ. ดร. ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รศ. ดร. นิสิต กิตติพงษ์พัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ. ดร. ณัฐา โพธาภรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ตีนฮุ้งดอยเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้กันอย่างยาวนาน และมีการบันทึกในตำรายาจีนมากว่า 4,000 ปี เหง้าของตีนฮุ้งดอยมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการห้ามเลือด ต่อต้านเนื้องอก และมะเร็ง ด้วยสรรพคุณดังกล่าวจึงมีการใช้ตีนฮุ้งดอยปริมาณมาก ส่งผลให้ประชากรของตีนฮุ้งดอยลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงตีนฮุ้งดอยในสภาพปลอดเชื้อและองค์ประกอบทางเคมี ตลอดจนศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของตีนฮุ้งดอย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงตีนฮุ้งดอยจากอวัยวะต่างๆ ได้แก่ เมล็ด ลำต้นเทียม และเหง้าในสภาพปลอดเชื้อ นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 30% ซึ่งมีเปลือกหุ้ม จากนั้นแกะเปลือกหุ้มเมล็ดนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร E-20, MS, Gamborg B5 และน้ำภายใต้อุณหภูมิ 15°C ในสภาพไม่มีแสง พบว่าเมล็ดที่ไม่มีเปลือกหุ้มซึ่งเพาะบนน้ำ มีความงอก 100 % ภายใน 15 เดือน ส่วนอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 3 สูตรไม่สามารถงอกได้ ดังนั้นจึงศึกษาปัจจัยต่างๆ ได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ และจิบเบอเรริกแอซิด (GA_3) ต่อการทำลายระยะพักตัวของเมล็ดตีนฮุ้งดอย การศึกษาผลของอุณหภูมิ โดยนำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อและไม่มีเปลือกหุ้มเมล็ด มาเพาะเลี้ยงบนน้ำ ภายใต้อุณหภูมิ 5, 10, 12, 14, 16 และ 18 °C พบว่าอุณหภูมิ 14 และ 16°C เมล็ดสามารถงอกได้ 100 % ในเวลา 15 เดือน สำหรับการศึกษาผลของอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 4°C และ 22°C สลับกันและทำซ้ำ 4 ครั้ง พบว่าเมล็ดไม่สามารถงอกได้ นอกจากนี้การศึกษาผลของ GA_3 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 mg/l พบว่าเมล็ดไม่สามารถงอกได้เช่นกัน สรุปได้ว่าเมล็ดตีนฮุ้งดอยมีการพักตัวทางสรีรวิทยาระดับสูงสุด และ GA_3ไม่มีผลต่อการทำลายการพักตัวของเมล็ด

การขยายพันธุ์ตีนฮุ้งดอย จากการเพาะเลี้ยงลำต้นเทียมที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอรอกซ์ 15 % บนอาหาร MS ภายใต้แสง 16 ชม./วัน ความเข้มแสง 27.8 $\mu mole.m^{-2}.s^{-1}$ อุณหภูมิ 5, 10, 12, 14, 16, 18 และ 27 °C พบว่าอุณหภูมิที่ 14 และ 16 °C มีอัตราการรอดชีวิต 80 และ 100% ตามลำดับ และมีการปนเปื้อน 20 และ 40% ตามลำดับ การศึกษาไซโตไคนินชนิดต่างๆ ได้แก่ BA, kinetin, TDZ และ zeatin ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงปลายยอดของเหง้า โดยฟอกฆ่าเชื้อปลายยอดของเหง้าด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 5% เวลา 5 นาที ตามด้วยสารละลายคลอรอกซ์ความเข้มข้น 25% เวลา 15 นาที และเขย่าในสารละลาย PPM ความเข้มข้น 2 ppm เป็นเวลา 6 ชม.นำปลายยอดที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม BA, kinetin, TDZ และ zeatin ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 mg/l ร่วมกับ สารปฏิชีวนะ (PPM) ความเข้มข้น 2 ml/l ภายใต้อุณหภูมิ 15°C แสง 16 ชม/วัน เป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่า BA สามารถทำให้ปลายยอดมีการเจริญเติบโตสูงสุด 2.5 cm การศึกษาผลของ BA ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 mg/l ร่วมกับ PPM ความเข้มข้น 2 ml/l พบว่าอาหาร MS ที่มี BA 5 mg/l ร่วมกับ PPM 2 ml/l ทำให้ปลายยอดของเหง้าตีนฮุ้งดอยมีความสูงมากสุด 7 cm และมีอัตราการขยายพันธุ์ที่ 1 : 1.2 ภายในระยะเวลา 90 วัน ในขณะที่การเติม adenine sulfate ที่ความเข้มข้น. 0, 50, 100, 150 mg/l ร่วมกับ BA 5 mg/l และ PPM 2 ml/l ในอาหาร MS พบว่า ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของตีนฮุ้งดอยในสภาพปลอดเชื้อ ดังนั้นจึงย้ายปลายยอดของเหง้าตีนฮุ้งดอยมาเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 0, 30, 60, 90 และ 120 g/l หรือเติม NAA ความเข้มข้น 0, 1, 2 mg/l เพื่อชักนำให้เกิดเหง้าในสภาพปลอดเชื้อ พบว่า การเติมน้ำตาลซูโครส หรือ NAA ในอาหารสูตร MS ไม่มีผลต่อการชักนำให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เกิดเหง้าในสภาพปลอดเชื้อ อย่างไรก็ตามการขยายพันธุ์ตีนฮุ้งดอยลำต้นเทียม และเหง้าเป็นไปได้ยาก เนื่องจากมีแบคทีเรียที่อยู่ภายใน ส่งผลให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของตีนฮุ้งดอยประสบความสำเร็จต่ำ ถึงแม้จะมีการใช้อุณหภูมิต่ำร่วมกับ PPM ก็ตาม และสรุปได้ว่าการขยายพันธุ์ตีนฮุ้งดอยทางเมล็ดเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดสามารถย่นระยะเวลาการพักตัวจาก 24 – 36 เดือนเป็น 15 เดือน และมีความงอกสูงสุด 100%

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบตีนฮุ้งดอยด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (TLC) พบว่าสารสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนมีสารประกอบกลุ่มสเตียรอยด์ และอัลคาลอยด์ ในขณะที่สารสกัดเมทานอลมีสารประกอบกลุ่มซาโปนิน และฟลาโวนอยด์ การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช พบว่าพบว่าสารสกัดหยาบไดคลอโรมีเทนจากตัวอย่างที่เก็บจากอำเภอแม่ริมแสดงฤทธิ์สูงสุดที่ค่า EC_{50} เท่ากับ 3.46±1.23 μmol TE/g ขณะที่สารสกัดหยาบจากการสกัดด้วยเมทานอลของตัวอย่างจากอำเภอแม่ริมมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60 ที่ค่า IC_{50} สูงสุด 0.77±0.1 μg/ml ผลฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งสองนี้แสดงถึงศักยภาพการประยุกต์ใช้สารสกัดจากตีนฮุ้งดอยในทางเภสัชกรรม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved