หลี่ หมิง : ฤทธิ์ของสารสกัดจากราก *Semiaquiegia adoxoides* ต่อเชื้อ tobacco mosaic virus (TMV) (BIOACTIVITY OF THE ROOT EXTRACT FROM *Semiaquiegia adoxoides* (DC.) MAKINO AGAINST TOBACCO MOSAIC VIRUS (TMV) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว, 194 หน้า.

การศึกษามีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดและแยกองค์ประกอบทางเคมีจากรากของ *Semiaquiegia adoxoides* ระบุชนิดและศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดต่อเชื้อ tobacco mosaic virus (TMV) และพัฒนาสูตรสารควบคุมสมุนไพรรัสจากสารสกัด นำรากของ *S. adoxoides* มาสกัดด้วยวิธี Systematic และ nonsystematic โดยใช้ปิโตรเลียมอีเธอร์ (PE) คลอโรฟอร์ม (C) เอทิลอะซิเตต (EA) อะซิโตน (A) บิวทานอล (B) เอธานอล (E) เมธานอล (M) และน้ำเป็นตัวทำละลาย จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์เชิงคุณภาพและทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ TMV โดยใช้ half leaf technique กับยาสูบใบเล็ก (*Nicotiana glutinosa*) ทั้งในสภาพใบตัด (in vitro) และสภาพพืชทั้งต้น (in vivo) เปรียบเทียบกับฤทธิ์ของสาร motoxydine hydrochloride copper acetate (Virus A) ซึ่งใช้ควบคุมโรคไวรัสที่ผลิตเป็นการค้า ผลการทดลองพบว่า วิธี systematic ให้ผลผลิตสารสกัด 38.76% ขณะที่วิธี nonsystematic ให้ผลผลิต 35.15% สารสกัดที่ได้จากการสกัดครั้งแรกด้วยเอธานอลในวิธี nonsystematic ประกอบไปด้วย แซคาไรด์ กรดอินทรีย์ แอนธราคิวริโนน ฟีนอล น้ำมันระเหย และอาจมีส่วนประกอบของอัลคาลอยด์ ฟลาโวนอย คูมาริน กรดอะมิโน แทนนิน สเตรอยด์ ไตรเตอร์พีน แต่ไม่พบโปตีนเปบไทด์ หรือลิปิด สารสกัด PE ประกอบด้วย อัคคาลอยด์ ขณะที่สารสกัด EA และ C ประกอบด้วยฟลาโวน ผลการวิเคราะห์สารสกัด PE ด้วยวิธี gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) พบสาร 31 ชนิด ซึ่งสามารถระบุชนิดได้ 12 ชนิดในระดับโครงสร้าง โดยส่วนประกอบที่เป็นน้ำมันระเหยมีส่วนผสมของ β-sitosterol 38.26% กรดลิโนเลอิค 18.73% กรดโอเลอิค 15.68% กรดปาล์มมิติล 13.5% และกรดสเตียริค 2.44% ผลการทดลองในสภาพใบตัดพบว่า สารสกัด PE A และ E สามารถทำให้ TMV เสื่อมสภาพได้สูงสุดเมื่อเทียบกับสารสกัดชนิดที่เหลือคือ 68.09% 63.28% และ 60.59% ตามลำดับ และสารสกัด PE ยังออกฤทธิ์ป้องกัน (protective) ได้สูงสุดคือ 62.26% ในทั้งสองกรณีการออกฤทธิ์ของสารสกัดสูงกว่าการออกฤทธิ์ของสารควบคุม Virus A การทดลองในสภาพทั้งต้นพบว่า ฤทธิ์ในการควบคุม TMV ของสารสกัด C EA และ PE เท่ากับ 42.04% 41.83% และ 33.14% ตามลำดับ ขณะที่ฤทธิ์ในการรักษาของสารสกัด EA PE และ C เท่ากับ 72.36% 50.26% และ 47.01% ตามลำดับ ในทั้งสองกรณีการออกฤทธิ์ของสารสกัดสูงกว่าของ Virus A ผลการทดสอบด้วยวิธี direct antigen coating indirect ELISA พบว่า การเพิ่มปริมาณของเชื้อ TMV ซึ่งประเมินจากค่า A 492 ช้าลงเมื่อยาสูบได้รับสารสกัด PE C EA B และ Virus A เมื่อเทียบกับยาสูบที่ไม่ได้รับสาร (ตำรับควบคุม) ค่า A 492 ที่วัดได้จากยาสูบที่ได้รับสารสกัด

มีค่าสูงสุดหลังจากได้รับ TMV 5 วัน ขณะที่ยาสูบให้ค่าสูงสุดใน 3 วัน ค่า A 492 ที่วัดได้จากยาสูบที่ได้รับสารสกัด C มีค่าต่ำสุด ตามด้วยสารสกัด PE EA และ Virus A ในการทดสอบฤทธิ์ของการคุ้มครอง สำหรับฤทธิ์ในการรักษา ค่า A 492 เริ่มลดลงใน 7 วัน และหลังจากยาสูบได้รับสารสกัดโดยสารสกัด EA ให้ค่าต่ำสุดคือ 0.128 ตามด้วย Virus A PE และ C ตามลำดับ ระยะเวลาในการป้องกันของสารละลาย PE C EA B และ Virus A เท่ากับ 18 13 13 8 และ 8 วัน ตามลำดับ การแยกสารด้วยวิธี column chromatograph จากสารสกัด C และ EA ซึ่งออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ TMV ได้สูงสุดได้ ส่วน B 4-3 เมื่อล้าง (elute) คอลัมน์ด้วยคลอโรฟอร์ม-เมธานอล สัดส่วน 83 : 17 (v : v) และ C 5-5 เมื่อใช้คลอโรฟอร์ม-เมธานอล สัดส่วน 75 : 25 (v : v) ส่วน B 4-3 มีฤทธิ์ป้องกัน และรักษาการติดเชื้อ TMV 52.54% และ 48.69% ตามลำดับ ขณะที่ส่วน C 5-5 มีฤทธิ์ยับยั้ง TMV 42.98% และ 62.45% ตามลำดับ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในยาสูบที่ปลูกเชื้อ TMV พบว่า เมื่อยาสูบได้รับสารสกัดก่อนได้รับเชื้อไวรัส เอนไซม์คาตาเลส (CAT) เปอร์ออกซิเดส (POD) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD) มีกิจกรรมลดลงเมื่อเทียบกับยาสูบที่ไม่ได้รับสารสกัด เวลาที่กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสามชนิดมีค่าสูงสุด ช้าลงกว่าเวลาของกิจกรรมในยาสูบที่ไม่ได้รับสารสกัด 2 วันซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดการเพิ่มปริมาณของ TMV โดยวิธี ELISA กิจกรรมของเอนไซม์ในยาสูบลดลงมากที่สุดเมื่อได้รับสารสกัด PE Virus A และ EA ตามลำดับ เมื่อยาสูบได้รับเชื้อ TMV ก่อนได้รับสารสกัด กิจกรรมของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันกับการได้รับเชื้อ TMV หลังได้รับสารสกัด แต่ระดับที่ลดน้อยกว่าโดยยาสูบที่ได้รับ Virus A กิจกรรมลดลงมากที่สุด ตามด้วยสารสกัด EA PE และ C ตามลำดับ ผลการศึกษาการยับยั้ง TMV ในสภาพใบตัด พบว่า กรดสเตียริค และ β-sitosterol ที่แยกได้จากสารสกัด PE เข้มข้น 10 มก./มล. สามารถทำให้เชื้อ TMV เสื่อมสภาพ 56.86% และ 50.73% ตามลำดับ กรดสเตียริคสามารถป้องกันการเข้าทำลายจากเชื้อ TMV ได้ 57.91% ขณะที่กรดโอเลอิคมีผลในการรักษา 37.10% ซึ่งสูงกว่าฤทธิ์ของ Virus A ในทั้งสองกรณี ผลของการศึกษาในสภาพทั้งต้นเหมือนกันกับการศึกษาในสภาพใบตัด แต่ต่างกันที่ระดับของความสามารถในการยับยั้ง ระยะเวลาที่สัมผัสเชื้อ และความเข้มข้นของสารที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อ TMV โดยที่การเพิ่มระยะเวลาและความเข้มข้นช่วยให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อสูงขึ้น การประเมินสูตร emulsion ในน้ำ (EW) ได้คัดเลือกสูตร TK#2 ซึ่งมีส่วนผสม C 5-5 20% dimethyl sulfoxide 15% OX-7513 emulsifier 10% carboxymethyl cellulose sodium 3% propylene glycol antifreeze 5% และน้ำ 47% มาใช้ทดสอบประสิทธิภาพควบคุมโรคจากเชื้อ TMV ในยาสูบ ทั้งในสภาพเรือนทดลองและสภาพไร่นา สูตรดังกล่าวสามารถทำให้เชื้อ TMV เสื่อมสภาพ ป้องกันการติดเชื้อ และรักษาอาการจากเชื้อ TMV ได้ 68.64% 62.05% และ 64.28% ตามลำดับ เมื่อทดสอบกับยาสูบ *N. glutinosa* การทดสอบกับ *N. tabacum* พันธุ์ K326 ในสภาพไร่นาที่ระดับเจือจาง 100 และ 200 เท่า พบว่าสามารถลดการเกิดโรคจาก

TMV ได้ 67.86% และ 65.16% เมื่อเทียบกับแปลงเปรียบเทียบ การวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง logarithm concentration กับ infection index ได้ค่าสมการ regression y = 1.0642x+1.9218 (r = 0.9908*) และ ค่า ED 50 เท่ากับ 724.44 มก./ล.

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

LI MING : BIOACTIVITY OF THE ROOT EXTRACT FROM *Semiaquilegia adoxoides* (DC.) MAKINO AGAINST TOBACCO MOSAIC VIRUS (TMV). THESIS ADVISOR : SOPONE WONGKAEW Ph.D., 194 PP.

*Semiaquilegia adoxoides* / ROOT EXTRACTS / ANTI-TMV BIOACTIVITY

The study was conducted to develop methods for extracting and separating chemical components from *Semiaquilegia adoxoides* (DC.) Makino root, to identify and study bioactivity of the extracted compounds against tobacco mosaic virus (TMV), and to develop an antiviral formulation from the extract. Roots of *S. adoxoides* were extracted by systematic and non-systematic methods using petroleum ether (PE), chloroform (C), ethyl acetate (EA), acetone (A), butanol (B), ethanol (E), methanol (M) and water (W) as solvents. Subsequently, the resulting extracts were qualitatively analysed and tested for bioactivity on TMV both in vitro and in vivo using a half leaf technique having *Nicotiana glutinosa* as a test plant comparing with that of moroxydine hydrochloride copper acetate (Virus A), a commercial antiviral agent. Results of the experiments showed that the systematic extraction method yielded 38.76% of total extracts while the nonsystematic methods yielded 35.15%. The crude ethanol extract of the nonsystematic method contained saccharide, organic acids, anthraqurinone, phenols, volatile oils and may contain alkaloids, flavonoids, coumarin, amino acids, tannin, steroids, triterpenes but not proteins, peptides, or lipids. The PE extract contained alkaloids while the EA and C extracts contained flavones. Results of the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis revealed 31 different substances in the PE extract in which 12 substances were identified at a structural level. The volatile oils in the extract composed of 38.26% β-sitosterol, 18.73% linoleic acid, 15.68% oleic acid, 13.51% palmitic acid and 2.44%

stearic acid. The in vitro bioactivity test using detached leaves showed that among the seven extracts, PE, A and E extracts had higher inactivation activity than that of the rest. The inactivation percentages were 68.09%, 63.28%, and 60.59% respectively. The PE extract also had the highest inhibition rate of 62.26% for protective effects. In both cases, the root extracts had significantly higher efficacy than that of the Virus A control. In the in vivo pot experiment, protection rates of C, EA and PE extracts were 42.04%, 41.83% and 37.14% respectively. EA, PE and C extracts also had high curing effects of 72.36%, 50.26%, and 47.01% respectively, which was significantly higher than that of Virus A. Results of the direct antigen coating (DAC) indirect ELISA showed that after treatment with the PE, C, EA, B extracts, and Virus A, TMV replication measured as $A_{492}$ was delayed compared to that of the control. The maximum $A_{492}$ values of the extract treated tobacco were reached in 5 days while that of the control in 3 days. $A_{492}$ of C extract treated tobacco was the lowest followed by that of the PE, EA extracts and virus A in the protective experiment. For curing activities, the $A_{492}$ started to decline, 7 days after the extract treatment whereas EA extract had the lowest $A_{492}$ value of 0.128 followed by Virus A, PE, and C extracts. The protective effect lasted 18, 13, 13, 8, and 8 days when tobacco was treated with PE, C, EA, B extracts and Virus A respectively. The column chromatograph of the C and EA extracts which showed the highest anti-TMV activity yielded B4-3 fraction when eluted with chloroform-methanol at 83 : 17 (V : V) ratio and C5-5 fraction when eluted with chloroform-methanol at 75 : 25 (V : V) ratio. With TMV, the B4-3 fraction had protective and curing effects of 52.54% and 48.69% while these of the C5-5 fraction were 42.98% and 62.45% respectively. Results of monitoring enzymatic changes in TMV infected leaf tissue indicated that when the extracts were applied

prior to TMV inoculation, catalase (CAT), peroxidase (POD), and superoxide dismutase (SOD) activities were reduced compared to those of the control non-treated tobacco. The peak activities of the three enzymes were delayed for 2 days corresponding to the result of ELISA. Enzyme activities in the treated tobacco were reduced in the order of PE extract > Virus A > EA extract. When TMV was inoculated prior to the extract treatment, changes in enzyme activities were similar to that of the protective experiment except the decrease was not as high and the order of reduction was Virus A > EA > PE > C extracts. Results of anti-TMV assay in vitro of substances separated from the PE extract indicated that stearic acid and $\beta$-sitosterol at 10 mg/ml could inactivate 56.86% and 50.73% of TMV, respectively. The protective inhibition rate of stearic acid on TMV was 57.91% while the curing inhibition rate of oleic acid was 37.10%. Their control effects were significantly higher than that of Virus A. Results of the in vivo experiment were similar to these of the in vitro, but with different levels of inhibition. Both exposure time and concentration of the inhibitors had effects on an inhibition rate which increased when the two factors increased. After a series of emulsion in water (EW), formulations had been evaluated, the TK#2 containing 20% of C5-5 fraction, 15% of dimethyl sulfoxide solvent, 10% of OX-7513 emulsifier, 3% of carboxymethyl cellulose sodium thickener, 5% of ethylene glycol antifreezer and 47% of water was selected for controlling TMV in tobacco under both greenhouse and field conditions. On *N. glutinosa*, the TK#2 had inactivation, protection and curing percentages of 68.64%, 62.05% and 64.28% respectively. On *N. tabacum* K326 under field condition, TK#2 diluted 100X and 200X could reduce TMV infection 67.86% and 65.16% compared to that of the control plot. The correlation analysis between logarithm concentration

and infection index showed that regression equation was Y=1.0642X+1.9218 ($r = 0.9908^{*}$) and ED50 was 724.44 mg/l.

School of Crop Production Technology Student's Signature_____

Academic Year 2008 Advisor's Signature_____