

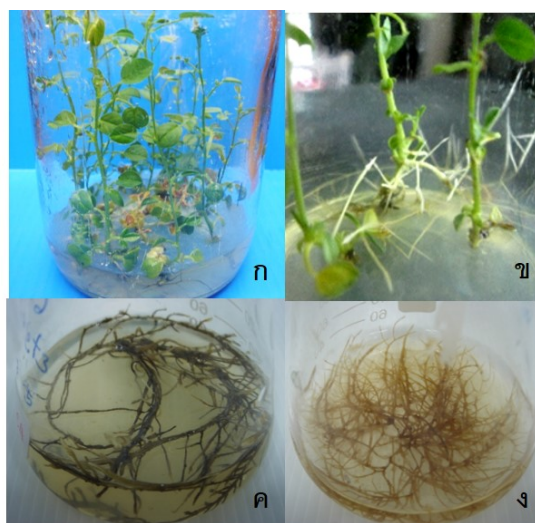
การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glaba* L.) ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ
In Vitro Culture of Licorice (*Glycyrrhiza glaba* L.) Root for Secondary Metabolite Production

วิภารัตน์ พิทักษ์ด้านธรรม ดำรงค์ศักดิ์ आयुวานานนท์ วิลาสินี กรกิจธรรมกุล
เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์ และศรีเมฆ ชาวโพงพาง
Wiparat Pitakdantham Dumrongsak Aryuwananon Wilasinee Kaweejithummakul
chetsadaporn Pitaksutheepong and Srimek Chowpongpan

ฝ่ายนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทรศัพท์ 02 9428600-3 aapwpr@ku.ac.th

ดำเนินงานเสร็จ พ.ศ.2558

ชะเอมเทศ การเพาะเลี้ยงราก การถ่ายยีน Root culture *Agrobacterium rhizogenes* *RolABCD* hairy root



การถ่ายยีน และการเพาะเลี้ยงรากฝอยชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อ (ก) ต้นชะเอมเทศ (ข)
รากฝอยที่มียีน *RolABCD* จากเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* A13 (ค) คัดเลือกและเพิ่ม
ปริมาณรากฝอยบนอาหารแข็ง (ง) เพาะเลี้ยงรากฝอยในอาหารเหลว

ชะเอมเทศเป็นพืชที่มีการสร้าง และสะสมสารสำคัญทางชีวภาพหลายชนิด โดยเฉพาะ glycyrrhizin ในส่วนของราก แต่เนื่องจากชะเอมเทศไม่สามารถปลูกเลี้ยงได้ในสภาพภูมิอากาศประเทศไทย การศึกษาวิจัยเรื่องการเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศ ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้สามารถผลิตสารสำคัญดังกล่าวได้ งานวิจัยนี้ได้ทำการถ่ายยีน *RolABCD* จากเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* เข้าสู่ลำต้นชะเอมเทศ จนสามารถชักนำให้เกิดรากฝอยที่มีศักยภาพในการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสภาพปลอดเชื้อ จากการวิเคราะห์เบื้องต้นพบว่ารากดังกล่าวมีการสร้างและสะสมสาร glycyrrhizin

ศูนย์สารสนเทศการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

โทร ๐-๒๕๖๑-๒๔๔๕ ต่อ ๕๒๑,๓๔๒

E-mail: ridm@nrct.go.th

การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra* L.) ในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ

In Vitro Culture of Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) Root for Secondary Metabolite Production

วิภารัตน์ พิทักษ์ด้านธรรม ดำรงศักดิ์ อายุวานานนท์ วิลาสินี กรวิกิจธรรมกุล

เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์ และศรีเมฆ ชาวโพพงพาง

Wiparat Pitakdantham Dumrongsak Aryuwananon Wilasinee Kaweejithummakul

chetsadaporn Pitaksutheepong and Srimek Chowpongpan

ฝ่ายนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทรศัพท์ 02 9428600-3 aapwpr@ku.ac.th

ดำเนินงานเสร็จ พ.ศ.2558

ชะเอมเทศ การเพาะเลี้ยงราก การถ่ายยีน Root culture *Agrobacterium rhizogenes* *rolABCD* hairy root

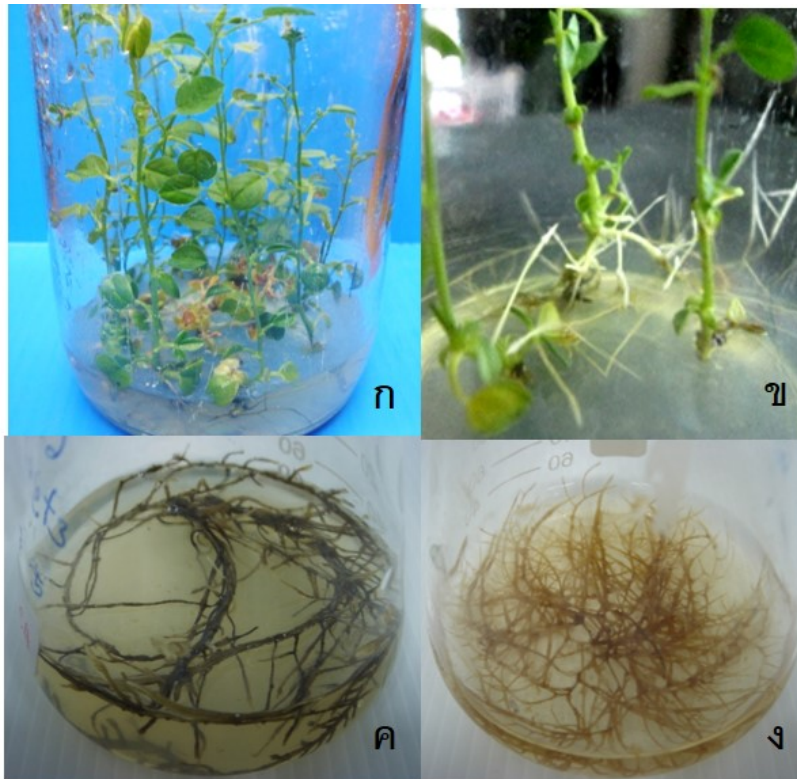
ชะเอมเทศเป็นพืชที่มีการสร้างและสะสมสารสำคัญทางชีวภาพที่มีคุณค่า สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายเช่นมี การใช้สารสกัดจากชะเอมเทศ ในเครื่องสำอาง ด้านอาหาร ชะเอมเทศเป็นสารที่ให้ความหวานแต่ไม่ให้อ้วน นอกจากนี้ยังมีงานวิจัย ชะเอมเทศ เกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ด้านอาการอักเสบ ด้านการเกิดมะเร็ง ด้านอาการภูมิแพ้ผิวหนัง ปัจจุบันมีรายงาน การศึกษาอย่างกว้างขวางด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ ไปจนถึงการเพิ่มปริมาณการ เพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรม รวมถึงการชักนำให้มีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิในเซลล์ที่เพาะเลี้ยง ข้อดีของการผลิตสารทุติยภูมิ จากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชคือ สามารถเพาะเลี้ยง และผลิตสารได้ตลอดทั้งปี สารที่ได้มีคุณภาพสม่ำเสมอ รากพืชนับเป็นส่วนหนึ่งของพืชที่มี ศักยภาพในการนำมาเพาะเลี้ยง เนื่องจากมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงรากพืช โดยมีการใช้ *Agrobacterium rhizogenes* ที่มียีน *rolABCD* อยู่ใน พลาสมิดโดยธรรมชาติ เมื่อชักนำให้ส่วน T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช ทำให้เซลล์พืชมีการพัฒนาเกิดเป็นรากฝอยจำนวนมาก นอกจากนั้นส่วน T-DNA ที่นำเข้าไปยังมีส่วนกระตุ้นให้รากฝอยที่เกิดขึ้นมีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิมากขึ้นด้วย เนื่องจาก ชะเอมเทศไม่สามารถปลูกเลี้ยงได้ในสภาพภูมิอากาศประเทศไทย คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในสภาพปลอด เชื้อ เพื่อการผลิตสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเฉพาะสารทุติยภูมิในกลุ่ม glycyrrhizin

งานวิจัยฉบับนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคในการเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* ในการถ่ายยีน *rolABCD* เข้าสู่เนื้อเยื่อชะเอมเทศ เพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างรากฝอย การเพาะเลี้ยงรากฝอย ในสภาพปลอดเชื้อ และการวิเคราะห์สาร glycyrrhizin ที่สะสมในรากฝอย พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่มี BAP 1.2 หรือ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดชะเอมเทศมีการสร้างยอดใหม่สูงสุด คือ 3.44 3.56 และ 3.00 ยอด ที่ระยะเวลา 30 วัน ยอดชะเอมเทศสามารถ เกิดรากได้ 100% เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA หรือ IAA ที่ ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงรากในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี GA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร รากชะเอมเทศมีการสร้างรากฝอยใหม่ดีที่สุด โดยเมื่อเลี้ยงในสภาพมืด รากเดิมมีการสร้างรากฝอยได้ดีกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง เมื่อทำการทดลองถ่ายยีน *rolABCD* โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ A13 พบว่าส่วนของ ลำต้นที่มีการสร้างบาดแผลโดยวิธีการจิ้ม สามารถสร้างรากฝอยได้ดีที่สุด และรากฝอยที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที จากการวิเคราะห์ราก ชะเอมเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อทั้งรากที่ได้รับการถ่ายยีน และรากที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค HPLC เมื่อต้นพบว่าราก ทั้งสองชนิดมีการสะสมสาร glycyrrhizin ซึ่งยังต้องศึกษาเชิงลึกต่อไปเพื่อทราบองค์ประกอบทางเคมีของสารทุติยภูมิอื่น ๆ จากสารสกัด รากชะเอมเทศ พร้อมทั้งเปรียบเทียบปริมาณสาร glycyrrhizin จากรากชะเอมเทศที่มีการถ่ายยีนและไม่มีการถ่ายยีน เพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อ และการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต รวมถึงการ เพาะเลี้ยงรากฝอยในระบบการเพาะเลี้ยงขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อให้สามารถผลิตสารสำคัญทางชีวภาพในสภาพปลอดเชื้อได้ในปริมาณมาก และคุ้มค่า จึงจะเกิดประโยชน์จากงานวิจัยนี้

ศูนย์สารสนเทศการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

โทร ๐-๒๕๖๑-๒๔๔๕ ต่อ ๕๒๑,๓๔๒

E-mail: ridm@nrct.go.th



การถ่ายยีน และการเพาะเลี้ยงรากฝอยชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อ (ก) ต้นชะเอมเทศ (ข) รากฝอยที่มียีน *RolABCD* จากเชื้อ *Agrobacterium rhizogenes* A13 (ค) คัดเลือกและเพิ่มปริมาณรากฝอยบนอาหารแข็ง (ง) เพาะเลี้ยงรากฝอยในอาหารเหลว

ศูนย์สารสนเทศการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

โทร ๐-๒๕๖๑-๒๔๔๕ ต่อ ๕๒๑,๓๔๒

E-mail: ridm@nrct.go.th