

กิติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยปีที่ 1 นี้ รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2556 ขอขอบคุณคณะกรรมการติดตามและประเมินผลโครงการที่ช่วยเสนอแนะ และให้คำแนะนำในการดำเนินการวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยประสานงานและอำนวยความสะดวกต่างๆ ซึ่งคณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

มกราคม 2559

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

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ดร.ศรีเมธ ขาวโพธิ์

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

50 ถ.งามวงศ์วาน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2579-1026

หัวหน้าโครงการ

ดร.วิภารัตน์ พิทักษ์ด้านธรรม (ชำนาญการ)

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่ออุตสาหกรรม ฝ่ายนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวภาพ

สถาบันคั่นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

50 ถ.งามวงศ์วาน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2942-8600-3

ผู้ร่วมโครงการ

นายดำรงศักดิ์ อายุวนานนท์

ฝ่ายนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวภาพ

สถาบันคั่นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

50 ถ.งามวงศ์วาน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2942-8600-3

นางสาววิลาสินี กวีกิจธรรมกุล

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเพื่ออุตสาหกรรม ฝ่ายนาโนเทคโนโลยีและเทคโนโลยีชีวภาพ

สถาบันคั่นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

50 ถ.งามวงศ์วาน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2942-8600-3 ต่อ 301

ดร. เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์

หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพอาหาร ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ปทุมธานี 12120 โทรศัพท์และโทรสาร 02-5646700

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2556 จำนวน 419,000.00 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 12 เดือน เริ่มทำการวิจัยเมื่อ (เดือน ปี) กรกฎาคม 2556

บทคัดย่อ

ชะเอมเทศเป็นพืชที่มีศักยภาพในการสร้าง และสะสมสารสำคัญทางชีวภาพ ด้วยการสะสมสารในกลุ่ม glycyrrhizin ในส่วนของลำต้น และราก แต่เนื่องจากชะเอมเทศไม่สามารถปลูกเลี้ยงได้ในสภาพภูมิอากาศประเทศไทย การศึกษาวิจัยเรื่องการเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้สามารถผลิตสารสำคัญดังกล่าวได้ รายงานผลการวิจัย ปีที่1 ฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคในการเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อ รวมถึงการทดลองถ่ายยีนที่มีผลในการกระตุ้นให้พืชมีการสร้างรากฝอยจำนวนมาก อีกทั้งมีการสร้างและสะสมสารสำคัญทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น เริ่มจากการพอกฆ่าเชื้อเมล็ดชะเอมเทศพบว่า วิธีการที่เหมาะสมในการพอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดชะเอมเทศคือ แช่เมล็ดในเอทานอล 70% นาน 1 นาที จากนั้นพอกฆ่าเชื้อด้วย sodium hypochlorite 10% ร่วมกับ tween-20 0.02% นาน 10 ถึง 20 นาที การชักนำให้ยอดชะเอมเทศเกิดยอดใหม่จำนวนมากโดยทำการเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ ได้แก่ BAP kinetin และ TDZ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงยอดบนอาหารสูตร MS ที่มี BAP 1 2 หรือ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ยอดชะเอมเทศมีการสร้างยอดใหม่สูงสุด คือ 3.44 3.56 และ 3.00 ยอด ที่ระยะเวลา 30 วัน ยอดชะเอมเทศสามารถเกิดรากได้ 100% เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA หรือ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการทดลองถ่ายยีน *rolABC* เข้าสู่ส่วนของ ราก ใบ และลำต้น ชะเอมเทศ โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 พลาสมิด pEXM120 เบื้องต้นพบว่ามีเฉพาะส่วนของรากที่สามารถสร้างรากใหม่ที่มียีน *rolABC* การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในอาหารเหลวสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเมื่อเลี้ยงรากในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี GA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร รากชะเอมเทศมีการสร้างรากฝอยใหม่ได้ดีที่สุด โดยเมื่อเลี้ยงในสภาพมืด รากเดิมมีการสร้างรากฝอยได้ดีกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกรเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง เมื่อทำการทดลองถ่ายยีน *rolABC* โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ A13 พบว่าส่วนของลำต้นที่มีการสร้างบาดแผลโดยวิธีการจิ้ม สามารถสร้างรากฝอยได้ดีที่สุด และรากฝอยที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที จากการวิเคราะห์รากชะเอมเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อทั้งรากที่ได้รับการถ่ายยีน และรากที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค HPLC เบื้องต้นพบว่ารากทั้งสองชนิดมีการสะสมสาร glycyrrhizin ซึ่งยังต้องศึกษาเชิงลึกต่อไปเพื่อทราบองค์ประกอบทางเคมีของสารทุติยภูมิอื่น ๆ จากสารสกัดรากชะเอมเทศ พร้อมทั้งเปรียบเทียบปริมาณสาร glycyrrhizin จากรากชะเอมเทศที่มีการถ่ายยีนและไม่มีการถ่ายยีน เพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพรในสภาพปลอดเชื้อ และการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ชะเอมเทศ การเพาะเลี้ยงราก การถ่ายยีน

Abstract

Licorice (*Glycyrrhiza glaba* L.) is a potential plant for producing and accumulating of secondary metabolites, glycyrrhizin, in stem and root. Since licorice cannot be grown in Thailand, the study of licorice root culture for producing secondary metabolites is an alternative method. In the first year, report is aimed to study the *in vitro* propagation of licorice, genes transferred of *rolABC* to induce hairy root, and increase accumulation of secondary metabolites. Licorice seeds were initiated by surface sterilization. The suitable procedure is soaked in 70% ethanol, for 1 minute, and shaken in 10% sodium hypochlorite combined with 0.02% tween-20 for 10 or 20 minutes. To establish shoots in multiplication medium, MS medium supplemented with BAP, kinetin and TDZ were used. The shoot multiplication medium supplemented with 1.0 2.0 and 3.0 mg/L BAP gave the highest shoot formation number, 3.44 3.56 and 3.00 shoots, within 30 days. Roots were produced 100% from shoots on MS medium without hormone, or supplemented with 1 mg/L IBA or IAA. The *rolABC* gene was transferred to root leaf and stem via *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 with plasmid pEXM120. Preliminary result showed that, new roots harboring *rolABC* was obtained from only initial root. *In vitro* cultured of licorice roots produced maximum hairy roots in liquid MS medium supplemented with 0.5 mg/L GA and 1 mg/L IAA. Root production in darkness was slightly better in light condition. *Agrobacterium rhizogenes* A13 were used for transferred *rolABCD*. The result showed that, making wound on the stem for gene transfer produced the highest of hairy root and the maximum hairy root was found in liquid MS medium supplemented with 40 g/L sucrose on shaker at 60 rpm. HPLC analysis, glycyrrhizin was found from crude extracts of both the gene transferred and control licorice root cultures. However, the qualitative and quantitative analysis of glycyrrhizin and other secondary metabolites should be investigated from both root cultures for supported to *in vitro* natural product cultures and other utilizations.

Keyword: Licorice, *Glycyrrhiza glaba* L., Root culture, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*