

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง

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

1.2 ชื่อคณะผู้วิจัย

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ดร.ศรีเมฆ ขาวโพธิ์พวง

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

หัวหน้าโครงการ

ดร.วิภารัตน์ พิทักษ์ดำรงธรรม (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

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2556 จำนวน 419,000.00 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 12 เดือน เริ่มทำการวิจัยเมื่อ (เดือน ปี) กรกฎาคม 2556

2. สรุปโครงการวิจัย

ชะเอมเทศเป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้รักษาโรคต่างๆหลายชนิด เช่น วัณโรคปอด หอบหืด โรคกระเพาะอาหาร หรือลำไส้เล็ก และหลอดลมอักเสบ อีกทั้งยังมีงานวิจัยนำสารสกัดจากชะเอมเทศ มาใช้ในเครื่องสำอาง โดยมีสรรพคุณทำให้ผิวหน้าขาวกระจ่างขึ้น หรือยับยั้งการสร้างเม็ดสีผิว ในด้านอาหาร ชะเอมเทศเป็นสารที่ให้ความหวานแต่ไม่ให้พลังงาน จึงสามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยชะเอมเทศเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ด้านอาการอักเสบ ด้านการเกิดมะเร็ง ด้านอาการภูมิแพ้ผิวหนัง จากสรรพคุณของชะเอมเทศที่มีอยู่มากมาย คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยเฉพาะสารทุติยภูมิในกลุ่ม glycyrrhizin ซึ่งจะสามารถนำไปต่อยอดให้เกิดประโยชน์ได้ในทางเภสัชวิทยา เครื่องสำอาง และอื่น ๆ ได้ในอนาคต ปัจจุบันเทคโนโลยีด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิกำลังเป็นที่สนใจ มีรายงานการศึกษาอย่างกว้างขวางทางด้าน การเพาะเลี้ยงเซลล์พืช ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการไปจนถึงการเพิ่มปริมาณการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรม รวมถึงการชักนำให้มีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิในเซลล์ที่เพาะเลี้ยง ข้อดีของการผลิตสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชคือ สามารถเพาะเลี้ยง และผลิตสารได้ตลอดทั้งปี สารที่ได้มีคุณภาพสม่ำเสมอ รากพืชนับเป็นส่วนหนึ่งของพืชที่มีศักยภาพในการนำมาเพาะเลี้ยง เนื่องจากการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงรากพืชโดยมีการใช้แบคทีเรียที่เรียกว่า *Agrobacterium rhizogenes* ที่มียีน *rolABCD* อยู่ในพลาสมิด โดยธรรมชาติ หรือ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มียีน *rolABC* ในพลาสมิด เพื่อชักนำให้ส่วน T-DNA เข้าไปในเซลล์พืช ทำให้เซลล์พืชมีการพัฒนาเกิดเป็นรากฝอยเป็นจำนวนมาก โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีราคาแพงเพื่อชักนำให้เกิดราก ซึ่งจะสามารถช่วยลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงรากพืชได้เป็นอย่างมาก นอกจากนั้นส่วน T-DNA ที่นำเข้าไปยังมีส่วนกระตุ้นให้รากที่เกิดขึ้นมีการสร้างและสะสมสารทุติยภูมิมากขึ้นด้วย รายงานผลการวิจัย ปีที่ 1 ฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคในการเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อ รวมถึงการทดลองถ่ายยีนที่มีผลในการกระตุ้นให้พืชมีการสร้างรากฝอยจำนวนมาก อีกทั้งมีการสร้างและสะสมสารสำคัญทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น เริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดชะเอมเทศพบว่า วิธีการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดชะเอมเทศคือ แช่เมล็ดในเอทานอล 70% นาน 1 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย 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 3.00 3.44 และ 3.56 ยอด ที่ระยะเวลา 30 วัน ยอดชะเอมเทศสามารถเกิดรากได้ 100% เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต หรือเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี IBA หรือ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการทดลองถ่ายยีน *rolABC* เข้าสู่ส่วนของ ราก ใบ และลำต้นชะเอมเทศ โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 พลาสมิด pEXM120 เบื้องต้นพบว่าเมื่อเพาะส่วนของรากที่สามารถสร้างรากใหม่ที่มียีน *rolABC* การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในอาหารเหลวสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเมื่อเลี้ยงรากในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี GA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร รากชะเอมเทศมีการสร้างรากฝอยใหม่ดีที่สุด โดยเมื่อเลี้ยงในสภาพมืด รากเดิมมีการสร้างรากฝอยได้ดีกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกรเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง เมื่อทำการทดลองถ่ายยีน *rolABC* โดยใช้ *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ A13 พบว่าส่วนของลำต้นที่มีการสร้างบาดแผลโดยวิธีการจี้ สามารถสร้างรากฝอยได้ดีที่สุด และรากฝอยที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที จากการวิเคราะห์รากชะเอมเทศที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อทั้งรากที่ได้รับการถ่ายยีน และรากที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยเทคนิค HPLC เบื้องต้นพบว่า รากทั้งสองชนิดมีการสะสมสาร glycyrrhizin แต่ยังคงต้องศึกษาเชิงลึกต่อไปเพื่อทราบองค์ประกอบทางเคมีของสารทุติยภูมิอื่น ๆ จากสารสกัดรากชะเอมเทศ พร้อมทั้งเปรียบเทียบปริมาณสาร glycyrrhizin จากรากชะเอมเทศที่มีการถ่ายยีน

และไม่มีการถ่ายยีน เพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสมุนไพร และพัฒนาการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

3. บทคัดย่อ

ชะเอมเทศเป็นพืชที่มีศักยภาพในการสร้าง และสะสมสารสำคัญทางชีวภาพ ด้วยมีการสะสมสารในกลุ่ม glycyrrhizin ในส่วนของลำต้น และราก แต่เนื่องจากชะเอมเทศไม่สามารถปลูกเลี้ยงได้ในสภาพภูมิอากาศประเทศไทย การศึกษาวิจัยเรื่องการเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้สามารถผลิตสารสำคัญดังกล่าวได้ รายงานผลการวิจัย ปีที่1 ฉบับนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคในการเพิ่มปริมาณต้นพันธุ์ชะเอมเทศในสภาพปลอดเชื้อ รวมถึงการทดลองถ่ายยีนที่มีผลในการกระตุ้นให้พืชมีการสร้างรากฝอยจำนวนมาก อีกทั้งมีการสร้าง และสะสมสารสำคัญทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น เริ่มจากการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดชะเอมเทศพบว่า วิธีการที่เหมาะสมในการฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดชะเอมเทศคือ แช่เมล็ดในเอทานอล 70% นาน 1 นาที จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย 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 และลำต้นชะเอมเทศ โดยใช้ Agrobacterium tumefaciens สายพันธุ์ EHA105 พลาสมิด pEXM120 เบื้องต้นพบว่ามีเฉพาะส่วนของรากที่สามารถสร้างรากใหม่ที่มียีน rolABC การเพาะเลี้ยงรากชะเอมเทศในอาหารเหลวสภาพปลอดเชื้อ พบว่าเมื่อเลี้ยงรากในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี GA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร รากชะเอมเทศมีการสร้างรากฝอยใหม่ดีที่สุด โดยเมื่อเลี้ยงในสภาพมืด รากเดิมมีการสร้างรากฝอยได้ดีกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับรากเลี้ยงในสภาพที่มีแสงสว่าง 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

4. 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*