

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

VÕ CHÂU TUẤN

NGHIÊN CỨU NUÔI CẤY TẾ BÀO
CÂY NGHỆ ĐEN (*CURCUMA ZEDOARIA* ROSCOE)
VÀ KHẢO SÁT KHẢ NĂNG TÍCH LŨY MỘT SỐ
HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CHÚNG

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HUẾ - 2014

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

VÕ CHÂU TUẤN

**NGHIÊN CỨU NUÔI CÂY TẾ BÀO
CÂY NGHỆ ĐEN (*CURCUMA ZEDOARIA ROSCOE*)
VÀ KHẢO SÁT KHẢ NĂNG TÍCH LŨY MỘT SỐ
HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CHÚNG**

Chuyên ngành: SINH LÝ HỌC THỰC VẬT

Mã số: 62.42.30.05

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. GS. TS. Nguyễn Hoàng Lộc**
- 2. PGS. TS. Cao Đăng Nguyên**

HUẾ - 2014

LỜI CẢM ƠN

Hoàn thành luận án này, trước hết chúng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến GS. TS. Nguyễn Hoàng Lộc và PGS. TS. Cao Đăng Nguyên đã quan tâm giúp đỡ và hướng dẫn tận tình.

Xin được bày tỏ lòng biết ơn tới các cán bộ, giảng viên của Phòng thí nghiệm Các hợp chất thứ cấp, Viện Tài nguyên-Môi trường và Công nghệ sinh học, Đại học Huế; Bộ môn Sinh lý-Sinh hóa, Khoa Sinh học, Trường đại học Khoa học, Đại học Huế đã giúp đỡ chúng tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài.

Xin cảm ơn Ban Giám đốc, Ban Đào tạo Sau đại học của Đại học Huế; Ban Giám hiệu, Phòng Nghiên cứu Khoa học và Hợp tác Quốc tế, Phòng Đào tạo Sau đại học Trường đại học Khoa học; Ban Chủ nhiệm Khoa Sinh học, Trường đại học Khoa học, Đại học Huế; Ban Giám hiệu, Khoa Sinh-Môi trường, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng đã có nhiều giúp đỡ quý báu, tạo mọi điều kiện tốt nhất để chúng tôi hoàn thành luận án.

Xin cảm ơn các đồng nghiệp, bạn bè đã nhiệt tình động viên, hỗ trợ chúng tôi hoàn thành luận án.

Cuối cùng, xin được bày tỏ lòng biết ơn đến những người thân trong gia đình đã đóng góp một phần không nhỏ trong việc hoàn thành luận án này.

Huế, ngày 15 tháng 02 năm 2014

Tác giả

Võ Châu Tuấn

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi. Các số liệu, kết quả trình bày trong luận án là trung thực, khách quan, nghiêm túc và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Nếu có gì sai sót, tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm.

Tác giả

Võ Châu Tuấn

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN

LỜI CAM ĐOAN

MỤC LỤC

BẢNG CHÚ THÍCH CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC CÁC BẢNG

DANH MỤC CÁC HÌNH

MỞ ĐẦU	1
1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI.....	1
2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU	3
3. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN.....	3
4. ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	4
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. NUÔI CÂY TẾ BÀO THỰC VẬT	5
1.1.1. Sơ lược lịch sử nuôi cấy tế bào thực vật	5
1.1.2. Nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật	6
1.1.2.1. Nuôi cấy callus.....	6
1.1.2.2. Nuôi cấy huyền phù tế bào.....	7
1.1.2.3. Các thông số đánh giá khả năng sinh trưởng của tế bào	10
1.1.2.4. Một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi cấy tế bào	12
1.1.2.5. Nuôi cấy tế bào thực vật ở qui mô lớn.....	16
1.2. SỰ TÍCH LŨY CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP TRONG TẾ BÀO THỰC VẬT NUÔI CÂY <i>IN VITRO</i>	19
1.2.1. Vai trò của các hợp chất thứ cấp ở thực vật	19
1.2.2. Các nhóm hợp chất thứ cấp chủ yếu ở thực vật	19
1.2.2.1. Nhóm terpene	20
1.2.2.2. Nhóm phenol	20
1.2.2.3. Các hợp chất chứa nitrogen.....	20

1.2.3. Những nghiên cứu sản xuất các hợp thứ cấp từ nuôi cấy tế bào thực vật.....	21
1.2.3.1. Những nghiên cứu ngoài nước.....	21
1.2.3.2. Những nghiên cứu trong nước	25
1.3. GIỚI THIỆU VỀ CÂY NGHỆ ĐEN	28
1.3.2. Thành phần hóa học.....	28
1.3.3. Công dụng	30
1.3.3.1. Công dụng cổ truyền.....	30
1.3.3.2. Các hoạt tính sinh học	30
1.3.4. Tình hình nghiên cứu nuôi cấy <i>in vitro</i> của cây nghệ đen	35
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.	37
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	37
2.2. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	37
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	38
2.3.1. Nuôi cấy callus	39
2.3.2. Nuôi cấy huyền phù tế bào.....	39
2.3.2.1. Nuôi cấy huyền phù tế bào trong bình tam giác	39
2.3.2.2. Nuôi cấy huyền phù tế bào trong hệ lên men.....	40
2.3.3. Xác định khả năng sinh trưởng của tế bào	40
2.3.4. Định lượng tinh dầu	41
2.3.5. Định lượng curcumin	41
2.3.6. Định lượng polysaccharide hòa tan trong nước	42
2.3.7. Xác định sesquiterpene	42
2.3.8. Xác định hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu	43
2.3.9. Xử lý thống kê.....	43
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	44
3.1. NUÔI CẤY CALLUS NGHỆ ĐEN	44
3.2. NUÔI CẤY HUYỀN PHỤ TẾ BÀO TRONG BÌNH TAM GIÁC	47
3.2.1. Ảnh hưởng của cỡ mẫu nuôi cấy.....	47

3.2.2. Ảnh hưởng của tốc độ lắc	49
3.2.3. Ảnh hưởng của chất ĐHST	51
3.2.3.1. Ảnh hưởng của BA	51
3.2.3.2. Ảnh hưởng của 2,4-D.....	52
3.2.3.3. Ảnh hưởng của 2,4-D và BA	52
3.2.4. Ảnh hưởng của nguồn carbon.....	54
3.2.4.1. Ảnh hưởng của sucrose.....	54
3.2.4.2. Ảnh hưởng của glucose.....	56
3.3. NUÔI CẤY TẾ BÀO HUYỀN PHÙ TRONG HỆ LÊN MEN.....	59
3.3.1. Khảo sát sinh trưởng của tế bào	59
3.3.2. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy.....	61
3.3.2.1. Cỡ mẫu.....	61
3.3.2.2. Tốc độ khuấy.....	62
3.3.2.3. Ảnh hưởng của tốc độ sục khí.....	63
3.4. KHẢO SÁT SỰ TÍCH LŨY MỘT SỐ HỢP CHẤT CÓ HOẠT TÍNH	
SINH HỌC TRONG TẾ BÀO NGHỆ ĐEN.....	65
3.4.1. Hàm lượng tinh dầu	65
3.4.2. Hàm lượng polysaccharide hòa tan trong nước tổng số	67
3.4.3. Hàm lượng curcumin	68
3.4.4. Xác định sesquiterpene	73
3.5. HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA TINH DẦU TẾ BÀO NGHỆ ĐEN ...	77
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	80
NHỮNG CÔNG TRÌNH ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	
.....	82
TÀI LIỆU THAM KHẢO	83
PHỤ LỤC	

BẢNG CHÚ THÍCH CHỮ VIẾT TẮT

BAP	:	6-benzylaminopurine
BA	:	6-benzyladenine
CIB	:	centrifugal impeller bioreactor
cs	:	cộng sự
DMSO	:	dimethyl sulfoxide
ĐC	:	đối chứng
ĐHST	:	điều hòa sinh trưởng
HPLC	:	high performance liquid chromatography (sắc ký hiệu năng cao áp)
IAA	:	indoleacetic acid
IBA	:	indolebutyric acid
Kin	:	kinetin
L	:	lít
L-DOPA	:	L-3,4 -dihydroxyphenylamine
LPS	:	lipopolysaccharide
MS	:	Murashige và Skoog (1962)
NAA	:	naphthaleneacetic acid
Nxb	:	nhà xuất bản
TNF- α	:	tumor necrosis factor-alpha
2,4-D	:	2,4-dichlorophenoxyacetic acid

DANH MỤC CÁC BẢNG

TT	Tên bảng	Trang
1	Bảng 3.1. Khả năng tạo callus từ bẹ lá của cây nghệ đen <i>in vitro</i>	44
2	Bảng 3.2. Ảnh hưởng của chất ĐHST lên sinh trưởng và phát sinh hình thái của callus	46
3	Bảng 3.3. Ảnh hưởng của cỡ mẫu lên sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù trong bình tam giác	48
4	Bảng 3.4. Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù trong bình tam giác	50
5	Bảng 3.5. Ảnh hưởng của BA lên sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù trong bình tam giác	51
6	Bảng 3.6. Ảnh hưởng của 2,4-D lên sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù trong bình tam giác	52
7	Bảng 3.7. Ảnh hưởng của 2,4-D và BA lên sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù trong bình tam giác	53
8	Bảng 3.8. Ảnh hưởng của sucrose lên sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù trong bình tam giác	54
9	Bảng 3.9. Ảnh hưởng của glucose lên sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù trong bình tam giác	56
10	Bảng 3.10. Ảnh hưởng của fructose lên sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù trong bình tam giác	57
11	Bảng 3.11. Ảnh hưởng của cỡ mẫu lên sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù trong hệ lên men 10 L	62
12	Bảng 3.12. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy lên sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù trong hệ lên men 10 L	63
13	Bảng 3.13. Ảnh hưởng của tốc độ sục khí lên sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù trong hệ lên men 10 L	64

14	Bảng 3.14. Hàm lượng tinh dầu của tế bào nghệ đen nuôi cấy trong hệ lên men 10 L	66
15	Bảng 3.15. Hàm lượng polysaccharide của tế bào nghệ đen nuôi cấy trong hệ lên men 10 L	67
16	Bảng 3.16. Hàm lượng curcumin của tế bào nghệ đen nuôi cấy trong hệ lên men 10 L	69
17	Bảng 3.17. Chiều cao phổ hấp thụ (mAU) của sesquiterpene trong tế bào nuôi cấy ở hệ lên men 10 L và tế bào củ nghệ tự nhiên	74
18	Bảng 3.18. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tế bào nghệ đen	78