



ĐÁNH GIÁ ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA CÂY PHONG HUỆ (*ZEPHYRANTHES ROSEA* (SPRENG) LINDL)

Huỳnh Kim Diệu¹ và Võ Thị Tuyết²

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

² Trung Tâm dạy nghề huyện Cờ Đỏ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/9/2014

Ngày chấp nhận: 07/11/2014

Title:

Evaluation of the genetic diversity and the antibacterial activity of Zephyranthes rosea (Spreng) Lindl

Từ khóa:

Đa dạng di truyền, Hoạt tính kháng khuẩn, Phong huệ

Keywords:

Genetic diversity, antibacterial activity, *Zephyranthes rosea* (Spreng) Lindl

ABSTRACT

Fifteen samples of *Zephyranthes rosea* (Spreng) Lindl in different places in the Mekong Delta (Vinh Long, Ben Tre, An Giang and Dong Thap province and Can Tho city) were collected. Their leaves were used for analyzing genetic diversity using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers and testing the antibacterial susceptibilities expressed as minimum inhibitory concentrations (MIC) of eight selected Gram positive and Gram negative strains: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* and *Edwardsiella tarda*. Results showed that: *Zephyranthes rosea* (Spreng) Lindl had genetic diversity and was divided into 5 groups. All of them had effective antibacterial activities against tested bacteria ($256 \mu\text{g/ml} \leq \text{MIC} \leq 4096 \mu\text{g/ml}$) with the most effectivity was against *Escherichia coli* (group 4 with MIC= $256 \mu\text{g/ml}$ and group 1 with MIC= $512 \mu\text{g/ml}$), followed by *Staphylococcus aureus* (group 5 with MIC= $1024 \mu\text{g/ml}$), lower effectivity was against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella ictaluri* (all of them with MIC= $2048 \mu\text{g/ml}$).

TÓM TẮT

Mười lăm mẫu cây Phong huệ (*Zephyranthes rosea* (Spreng) Lindl) được thu thập từ nhiều nơi thuộc Đồng bằng sông Cửu Long (tỉnh Vĩnh Long, Bến Tre, An Giang, Đồng Tháp và Thành phố Cần Thơ), được phân tích đa dạng di truyền bằng kỹ thuật DNA đa hình nhân bản ngẫu nhiên Random Amplified Polymorphic DNA) và thử hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp pha loãng trong thạch để xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) trên 8 chủng Gram dương và Gram âm tiêu biểu *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri* và *Edwardsiella tarda*. Kết quả cho thấy các mẫu Phong huệ có sự đa dạng về di truyền DNA và chia làm 5 nhóm. Cao Phong huệ có khả năng ức chế tất cả các chủng vi khuẩn thí nghiệm ($256 \mu\text{g/ml} \leq \text{MIC} \leq 4096 \mu\text{g/ml}$). Các nhóm cây Phong huệ tác động tốt nhất trên vi khuẩn *Escherichia coli* (nhóm Phong huệ 4 với MIC= $256 \mu\text{g/ml}$ và Phong huệ 1 với MIC= $512 \mu\text{g/ml}$), kế đến là vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (nhóm Phong huệ 5 với MIC= $1024 \mu\text{g/ml}$), tiếp theo là vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (tất cả 5 nhóm Phong huệ với MIC= $2048 \mu\text{g/ml}$).

1 GIỚI THIỆU

Phong huệ là cây trồng làm cảnh, dọc theo các lối đi trong vườn hoa hoặc trồng trong bồn hoa, có tên gọi khác là Lan báo vũ, hoa Thủy tiên, Tóc tiên hoa đỏ. Phong huệ có vẻ đẹp quý phái, hương thơm dịu mát, và nó cũng là một cây thuốc, có vị đắng, tính hàn, có tác dụng giải độc, tiêu viêm, hoạt huyết, lương huyết. Ở Vân Nam (Trung Quốc), dùng trị mụn nhọt ghê lở, đờn ngã sưng, rắn độc cắn, thổ huyết, băng huyết. Ở Việt Nam, Phong huệ được dùng trị rụng tóc, giảm ho, trị sốt, lỵ (Võ Văn Chi, 1999; Đỗ Tất Lợi, 2003). Hiện nay, chưa có nghiên cứu nào cho biết sự đa dạng của cây này. Để tìm hiểu thêm về cây cảnh đẹp có công dụng chữa bệnh này, nghiên cứu về sự thuần chủng và hoạt tính kháng khuẩn của cây Phong huệ được thực hiện, từ đó hi vọng chọn lọc ra được cây có hoạt tính kháng khuẩn cao, góp phần trong nghiên cứu tìm ra thuốc có thể từng bước thay thế vai trò kháng sinh tảo được đang dần bị đề kháng trong phòng trị bệnh.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Địa điểm thu mẫu: 15 mẫu Phong huệ từ 15 nơi khác nhau (khoảng cách tối thiểu giữa 2 cây gần nhau nhất là 5 km) tại một số huyện thuộc tỉnh Vĩnh Long, Bến Tre, An Giang, Đồng Tháp và Thành phố Cần Thơ được thu mẫu thực hiện phân ứng RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); các cây có sự khác biệt di truyền được

trồng lại ở huyện Cờ Đỏ, Thành phố Cần Thơ để lấy mẫu phân tích. Các chủng vi khuẩn sử dụng:

– Chủng vi khuẩn nguồn gốc từ viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh: *Staphylococcus aureus* 081008 (*S. aureus*), *Streptococcus faecalis* 010408 (*S. faecalis*), *Escherichia coli* 101008 (*E.coli*), *Pseudomonas aeruginosa* 111008 (*P. aeruginosa*), *Salmonella* spp. 291003 (*Sal. spp*), *Edwardsiella tarda* 280208 (*E. tarda*) và *Aeromonas hydrophila* 011004 (*A. hydrophila*).

– Chủng vi khuẩn nguồn gốc từ Khoa Thủy sản (Trường Đại học Cần Thơ): *Edwardsiella ictaluri* CFA 258 – An Giang, 2006 (*E. ictaluri*).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Nghiên cứu đa dạng di truyền

– Tách chiết DNA tổng số theo phương pháp CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) (Doyle, 1991).

– Sử dụng 20 primer ngẫu nhiên (của công ty First BASE, Malaysia) cho kỹ thuật RAPD, mỗi primer dài 10 nucleotide, thông tin về trình tự các primer sử dụng được trình bày trong Bảng 1.

– Dựa vào hình ảnh điện di sản phẩm RAPD, thống kê các băng xuất hiện và không xuất hiện, phân tích Cluster, vẽ sơ đồ hình nhánh thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các giống dựa trên ma trận khoảng cách Euclidean, bằng phần mềm Statistica 5.5 theo phương pháp UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath and Sokal, 1973).

Bảng 1: Trình tự các nucleotide của 20 primer được sử dụng trong phương pháp chỉ thị RAPD

STT	RAPD primer	Trình tự primer (5'.....3')	STT	RAPD primer	Trình tự primer (5'.....3')
1	OPA10	GTG ATC GCA G	11	OPE20	AAC GGT GAC C
2	OPA13	CAG CAC CCA C	12	OPG06	GTG CCT AAC C
3	OPB10	CTG CTG GGA C	13	OPH12	ACG CGC ATG T
4	OPD02	GGA CCC AAC C	14	OPH13	GAC GCC ACA C
5	OPD03	GTC GCC GTC A	15	OPK03	CCA GCT TAG G
6	OPD07	TTG GCA CGG G	16	OPL12	GGG CGG TAC T
7	OPE01	CCC AAG GTC C	17	OPL13	ACC GCC TGC T
8	OPE07	AGA TGC AGC C	18	OPP08	ACA TCG CCC A
9	OPE14	TGC GGC TGA G	19	OPP09	GTG GTC CGC A
10	OPE19	ACG GCG TAT G	20	OPP18	GGC TTG GCC T

2.2.2 Thử tính kháng khuẩn

Các cây có sự khác biệt về di truyền được trồng lại trong cùng điều kiện chăm sóc, dinh dưỡng. Sau 6 tháng, cây được sử dụng thử tính kháng khuẩn.

– Tất cả lá cây Phong huệ được sấy khô và chiết bằng phương pháp ngâm dầm với methanol, loại bỏ dung môi bằng máy cô quay đến cạn, được

cao thô, dùng thử tính kháng khuẩn, xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC (minimum inhibitory concentration) (Nguyễn Văn Đán và Nguyễn Viết Tựu, 1985).

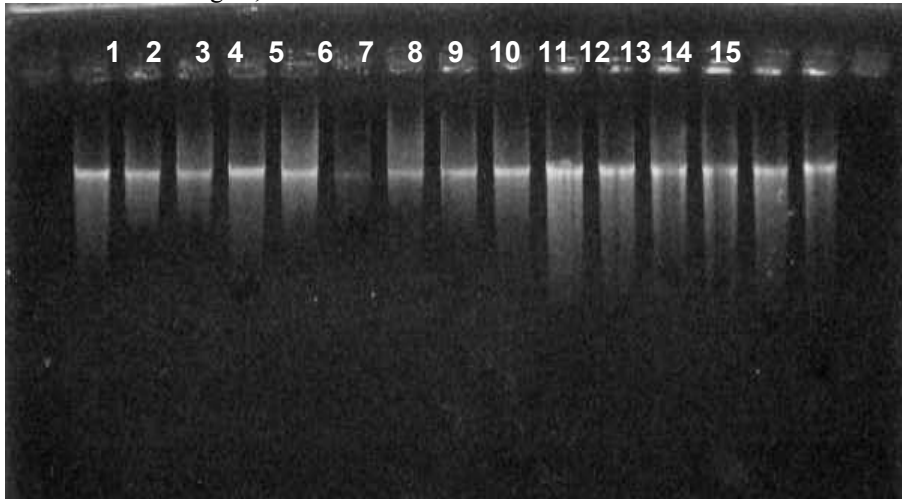
– Dùng phương pháp pha loãng liên tục trong thạch để xác định MIC (Trương Công Quyền và ctv., 1986; Từ Minh Koóng và ctv., 2001).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Sự đa dạng về di truyền

Sau khi tách chiết DNA tổng số, kiểm tra nhanh

sản phẩm bằng cách chạy điện di trên gel agarose 1%, tất cả các mẫu đều cho băng rõ, đều, kết quả được thể hiện ở Hình 1.



Hình 1: Kết quả điện di kiểm tra mẫu ly trích DNA của 15 mẫu cây Phong huệ

1 - 15 Số thứ tự theo thứ tự cây mẫu

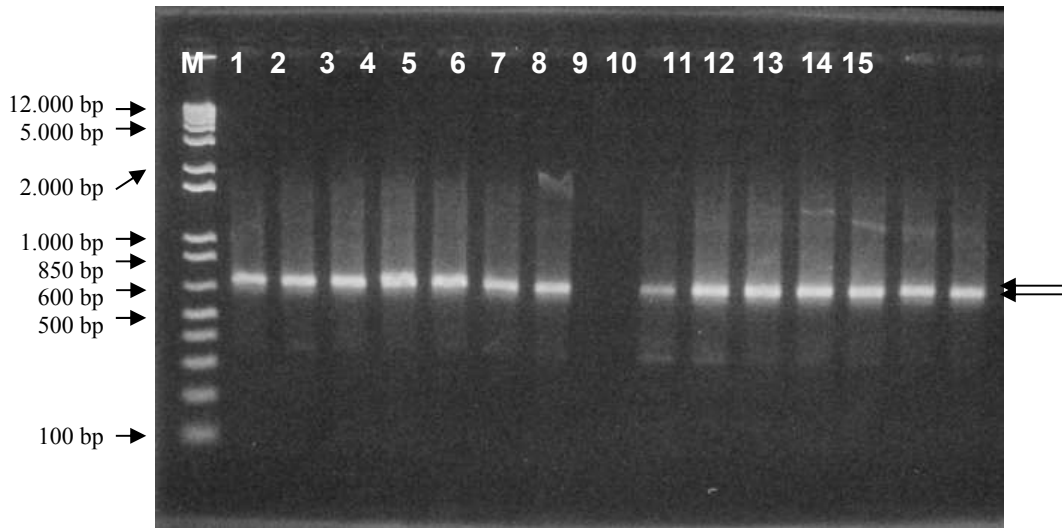
Để đánh giá sự đa hình của 15 mẫu cây Phong huệ, 20 primer RAPD đã được sử dụng trong phản ứng PCR. Qua kết quả thu được từ phổ điện di, có 9 primer khuếch đại rõ và băng DNA xuất hiện trên tất cả 15 mẫu Phong huệ. 11 primer còn lại sản phẩm PCR không khuếch đại trong tất cả các mẫu hoặc khuếch đại không hoàn toàn, hoặc do sản phẩm khuếch đại ít hay quá mờ không thể ghi nhận được. Kết quả của 9 primer trong thí nghiệm được trình bày ở Bảng 2. Tổng cộng có 52 băng được

ghi nhận với trung bình trên một primer là $5,78 \pm 2,59$, trong đó có 42 băng đa hình chiếm tỉ lệ cao là 80,77% với trung bình là $4,67 \pm 3,20$ băng đa hình trên mỗi primer.

Primer cho số băng ít nhất là OPP08 với tổng số băng thu được là 2 (Hình 2). Primer OPP09 có tổng số băng cao nhất, số băng ghi nhận được là 10 băng (Hình 3). Tỉ lệ đa hình cao nhất ghi nhận được ở primer OPA13, OPD03, OPL13, OPP08 và OPP09 (100%)(Bảng 2).

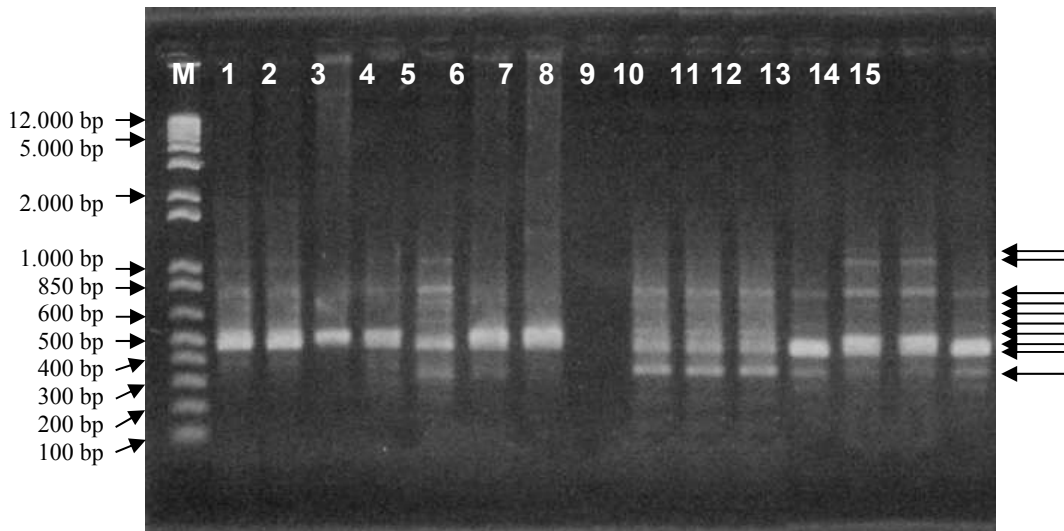
Bảng 2: Sự đa hình của 15 mẫu cây Phong huệ được phân tích trong kỹ thuật RAPD

TT	Primer	Tổng số băng DNA	Số băng đa hình	Tỉ lệ đa hình (%)	Số thứ tự băng đa hình
1	OPA13	8	8	100,0	1,2,3,4,5,6,7,8
2	OPD03	5	5	100,0	1,2,3,4,5
3	OPE07	4	2	50,0	1,4
4	OPH12	8	8	100,0	1,2,3,4,5,6,7,8
5	OPH13	6	2	33,3	4,5
6	OPL12	6	2	33,3	2,6
7	OPL13	3	3	100,0	1,2,3
8	OPP08	2	2	100,0	1,2
9	OPP09	10	10	100,0	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10
Tổng cộng		52	42		
Trung bình		5,78	4,67	80,77	
± SD		2,59	3,20		



Hình 2: Phổ điện di của primer OPP08

M: ladder 1 Kb plus (Invitrogen), số thứ tự là thứ tự của cây mẫu, mũi tên chỉ băng đa hình (←)



Hình 3: Phổ điện di của primer OPP09

M: ladder 1 Kb plus (Invitrogen), số thứ tự là thứ tự của cây mẫu, mũi tên chỉ băng đa hình (←)

Sau khi thu được kết quả từ phổ điện di RAPD, số liệu được mã hóa theo hệ nhị phân theo qui tắc có băng ghi 1 và không có băng ghi 0. Số liệu được dùng để tạo ra ma trận tương đồng từ đó dẫn đến cây phá hệ. Sơ đồ hình nhánh thể hiện sự tương quan di truyền giữa 15 mẫu cây Phong huệ được trình bày qua Hình 4.

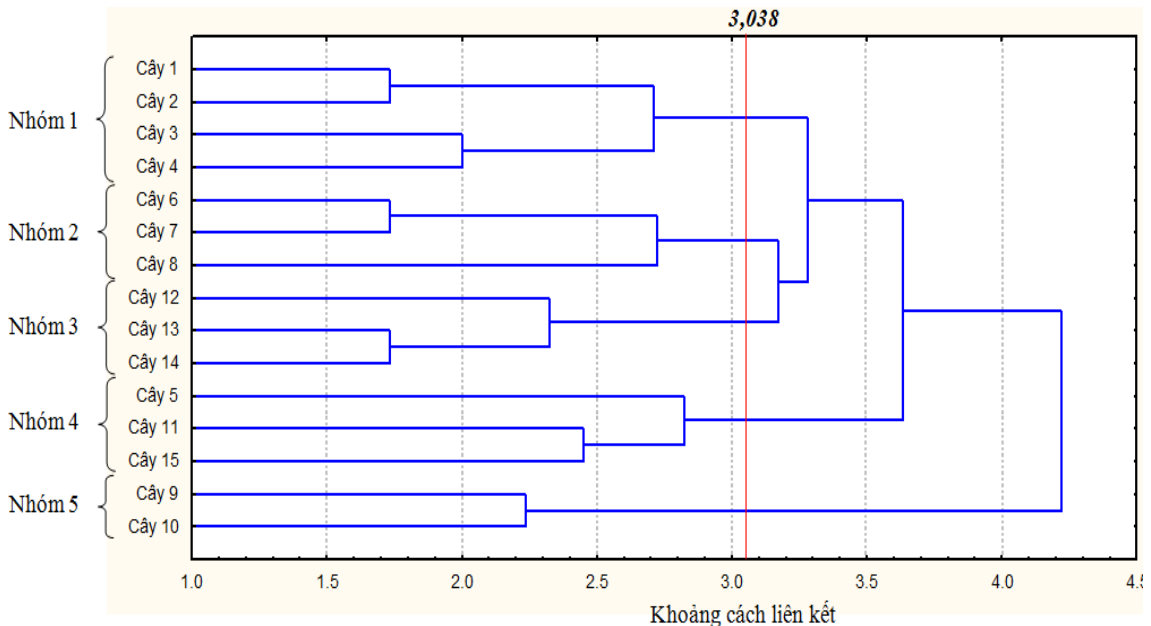
Kết quả sơ đồ hình nhánh (Hình 4) Phong huệ được chia làm 5 nhóm chính:

- Nhóm 1: gồm 4 cây: 1, 2, 3 và 4. Các cây này có quan hệ với nhau nằm trong khoảng từ 1,732 đến 3,162.
- Nhóm 2: gồm 3 cây: 6, 7 và 8. Các cây này có quan hệ với nhau nằm trong khoảng từ 1,732 đến 3,000.
- Nhóm 3: 3 cây: 12, 13 và 14. Các cây này có quan hệ với nhau nằm trong khoảng từ 1,732 đến 2,646.

- Nhóm 4: gồm 3 cây: 5, 11 và 15. Các cây này có quan hệ với nhau nằm trong khoảng từ 2,449 đến 3,000.
- Nhóm 5: gồm 2 cây: 9 và 10. Hai cây này có quan hệ với nhau với khoảng cách liên kết đi

truyền là 2,236 .

Qua kết quả phân tích từ marker RAPD, cho thấy 15 mẫu Phong huệ được nghiên cứu có sự đa dạng về di truyền, với khoảng cách liên kết dao động tương đối cao trong khoảng 1,732 đến 4,796.



Hình 4: Sơ đồ hình nhánh thể hiện mối quan hệ giữa các cây Phong huệ theo kiểu phân nhóm UPGMA, dựa trên marker RAPD

3.2 Thử tính kháng khuẩn

Kết quả thử tính kháng khuẩn của các cây

Phong huệ có sự khác biệt di truyền được trình bày qua Bảng 3.

Bảng 3: Nồng độ ức chế tối thiểu của các nhóm Phong huệ (µg/ml)

Nhóm	Vi khuẩn								
	<i>S. aureus</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Sal. spp</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>E. ictaluri</i>	<i>E. tarda</i>	
1	4096	4096	512	4096	4096	2048	2048	2048	
2	4096	4096	4096	2048	4096	2048	2048	2048	
3	4096	4096	4096	4096	2048	2048	2048	2048	
4	4096	4096	256	4096	4096	2048	2048	2048	
5	1024	4096	4096	4096	4096	2048	2048	4096	

Qua Bảng 3 cho thấy:

Khả năng ức chế các chủng vi khuẩn của các nhóm Phong huệ không giống nhau và trong cùng nhóm Phong huệ cũng có sự khác biệt. Nhóm 4 ức chế mạnh trên vi khuẩn *E. coli* (MIC = 256 µg/ml), kể đến nhóm 1 (MIC = 512 µg/ml). Nhóm 5 ức chế tốt trên *S.aureus* (MIC = 1024 µg/ml). Tuy nhiên, các nhóm Phong huệ đều ức chế giống nhau trên nhóm vi khuẩn *A.hydrophila* và *E.ictaluri* (MIC = 2048 µg/ml) và cùng ức chế kém trên *S. faecalis* (MIC = 4096 µg/ml).

Khả năng kháng khuẩn của Phong huệ trên vi khuẩn *E. coli* là rất cao (nhóm 4 với MIC = 256 µg/ml, nhóm 1 với MIC = 512 µg/ml). *E. coli* gây viêm nhiễm và bệnh đường ruột phổ biến trên gia súc và người. Vi khuẩn gây bệnh đường ruột ở ngựa, bê, cừu, heo và gia cầm non. Ở người vi khuẩn cũng có thể gây viêm phổi, viêm não, đặc biệt gây bệnh tiêu chảy ở trẻ em (Nguyễn Như Thanh và *ctv.*, 1997). Tình hình kháng thuốc của vi khuẩn này tăng nhanh theo thời gian. Theo Hoàng Hoài Phương và *ctv.* (2008), tỉ lệ kháng kháng sinh

của *E. coli* phân lập từ thực phẩm như sau: tetracycline (59,6%), chloramphenicol (50%), ampicillin (40,4%), nalidixic acid (20,5%), sulfamethoxazole và trimethoprim (45,5%), ciprofloxacin (10,9%), gentamicin (9,6%), amoxicillin/clavunic acid (7,7%), cefuroxime axetil (1,9%), amikacin (0,6%), cefepime (0,6%) và ceftriaxone (0,6%). Theo Văn Bích và ctv (2009), *E. coli* đề kháng với nhiều loại kháng sinh: nalidixic acid (47,18%), augmentin (31,62%), cotrimoxazole (50,94%), ciprofloxacin (38,86%), pefloxacin (25,47%), cefotaxime (38,68%), ceftriaxone (42,45%) và imipenem (5,66%). Theo Eryilmaz *et al.* (2010), *E. coli* có khả năng đề kháng cao với các nhóm kháng sinh: ampicillin (56%), ampicillin và sulbactam (24%), gentamycin (9%), ciprofloxacin (15%), cefazolin (12%), trimethoprim và sulfamethoxazol (36%). Theo Rabia *et al.* (2012), vi khuẩn *E. coli* nhạy cảm thấp với amoxicillin (5,8%), amikacin (32,9%), cefaclor (43,5%), clavulanic (38,7%), ciprofloxacin (42,9%), enrofloxacin (40,3%), nalidixic acid (28,7%), norfloxacin (38,1%), doxycycline (18,7%), ampicillin (6,8%), sulmathoxazole/trimethoprim (32,2%).

Cao Phong huệ cũng tác động tốt trên *S.aureus* (nhóm 5, MIC = 1024 µg/ml). *S.aureus* gây ra nhiều bệnh nhiễm trùng, tạo mủ và gây độc ở người. Thường gây nhọt hoặc gây ra nhiều bệnh viêm nhiễm quan trọng như viêm phổi, viêm vú, viêm tĩnh mạch, viêm màng não, nhiễm trùng tiểu và nhiều bệnh nguy hiểm khác như viêm tủy xương, viêm màng trong tim. Tụ cầu cũng là nguyên nhân gây nhiều vụ ngộ độc thực phẩm do tạo độc tố ruột enterotoxin trong thực phẩm và gây hội chứng sốc do tạo siêu kháng nguyên trong máu (Todar, 2005). Chúng *S.aureus* đề kháng cao với penicillin (89,4%), kế tiếp là tetracycline (82,4%), trimethoprim-sulfamethazine (80,6%), chloramphenicol (64,8%), erythromycin (38,4%) và methicillin (35,9%), những kháng sinh có hoạt lực mạnh như ceftriazol, ciprofloxacin cũng bắt đầu bị vi khuẩn này kháng lại (Lê Huy Chính, 2003).

Kết quả thử tính kháng khuẩn của Phong huệ cũng lý giải được sự sử dụng Phong huệ trị mụn nhọt ghê lở, ho, lỵ của dân gian (Võ Văn Chi, 1999).

Việc phát hiện tính kháng khuẩn của Phong huệ trên các loài vi khuẩn có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong tìm những thuốc mới có khả năng

kháng khuẩn điều trị các bệnh ở gia súc thay thế kháng sinh hóa dược đang bị kháng thuốc.

4 KẾT LUẬN

Thông qua các dữ liệu chỉ thị RAPD cho thấy Phong huệ không thuần chủng mà gồm 5 nhóm. Khả năng kháng khuẩn của các nhóm không giống nhau, nhóm 4 ức chế mạnh trên vi khuẩn *E. coli* (MIC = 256 µg/ml), kế đến nhóm 1 (MIC = 512 µg/ml), nhóm 5 ức chế tốt trên *S.aureus* (MIC = 1024 µg/ml).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi, 2003. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Y học.
2. Dolye J. J., 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation, In: Hewitt GM (ed) Molecular techniques intaxonomy, Springer, Berlin. Heidelberg New York. Pp. 283 – 293.
3. Eryilmaz, M., E. B. Merve, M. Muharrem, Yildiz and A. Ahmet, 2010. Antimicrobial resistance of urinary Escherichia coli isolates. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. April, 9(2): 205-209.
4. Hoàng Hoài Phương, Nguyễn Thị Kê, Phạm Hùng Vân, Nguyễn Đỗ Phúc, Nguyễn Thị Anh Đào và Trần Thị Ngọc Phương, 2008. Khảo sát gen kháng kháng sinh của một số vi khuẩn gây bệnh phân lập từ thực phẩm. Y học TP. Hồ Chí Minh. 12(4): 283-290.
5. Todar Kenneth, 2005. Todar's online Textbook of bacteriology University of Wisconsin – Madison Department of Bacteriology (Staphylococcus).
6. Lê Huy Chính, 2003. Vi sinh vật y học. NXB Y học, Hà Nội.
7. Nguyễn Như Thanh, Nguyễn Bá Hiền và Trần Thị Lam Hương, 1997. Vi sinh thú y. Nhà xuất bản Nông nghiệp. 215-239.
8. Nguyễn Văn Đàn và Nguyễn Viết Trụ, 1985. Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc. Thành Phố Hồ Chí Minh. NXB Y học.
9. Rabia, T., H. Rubeena., H. Shahida, 2012. Prevalence of multiple drug resistant Escherichia coli in patients of urinary tract infection registering at a diagnostic laboratory in Lahore, Pakistan. Pakistan J. Zool, American society for microbiology.44(3), 707.

10. Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal, 1973. Numerical taxonomy, Freeman, San Francisco, p.573.
11. Trương Công Quyền và ctv, 1986. Thực hành dược khoa. NXB Y học.
12. Từ Minh Koóng và ctv, 2001. Kỹ thuật sản xuất dược phẩm Tập I. Đại học Dược Hà Nội.
13. Văn Bích, Dương Anh Dũng, Bùi Ngọc An Pha, Nguyễn Sử Minh Tuyết, Võ Thị Trà An và Nguyễn Thanh Tùng, 2009. Khảo sát về đề kháng kháng sinh của Escherichia coli ở bệnh viện nhân dân Gia Định. Y học thành phố Hồ Chí Minh. 13(6): 253-254.
14. Võ Văn Chi, 1999. Từ điển cây thuốc Việt Nam. NXB Y học. TP Hồ Chí Minh.