Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
website: sj.ctu.edu.vn

ĐÁNH GIÁ SỰ THUẦN CHỦNG VÀ TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA CÂY HẸ (ALLIUM TUBEROSUM ROXB. ET SPRENG)

Huỳnh Kim Diệu[1] và Võ Thị Tuyết[2]

[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 Allium tuberosum Roxb. et Spreng

Từ khóa:
Hẹ, đa dạng di truyền, hoạt tính kháng khuẩn

Keywords:
Allium tuberosum Roxb. et Spreng, genetic diversity, antibacterial activity

ABSTRACT

To evaluate the genetic diversity and the antibacterial activity of Allium tuberosum Roxb. et Spreng, at first, the 15 plants in different places in the Mekong Delta were collected to analyze genetic diversity by using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers, then their leaves that were planted in the same soil conditions were taken for extracting by methanol and to test antibacterial activity expressed as minimum inhibitory concentration (MIC) against eight tested bacterial strains: Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella spp., Aeromonas hydrophila, Edwardsiella ictaluri and Edwardsiella tarda by agar dilution method. Results showed that: Allium tuberosum Roxb. et Spreng was divided into 3 groups with the genetic distance from1.000 to 6.325. Their leave's extracts had good antibacterial activity against tested bacterial strains (512 µg/ml ≤ MIC ≤ 4096 µg/ml). They had best effect on Staphylococcus aureus (group 1b and group 2 with MIC=512 µg/ml), followed by Escherichia coli (group 3 with MIC= 1024 µg/ml) and Streptococcus faecalis (group 1a with MIC= 1024 µg/ml).

TÓM TẮT

Để đánh giá sự đa dạng di truyền và khả năng kháng khuẩn của cây Hẹ (Allium tuberosum Roxb. et Spreng); trước tiên, 15 mẫu cây Hẹ ở các tỉnh thuộc Đồng bằng sông Cửu Long được chọn ngẫu nhiên để phân tích đa dạng di truyền bằng kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); kế đến ly trích bằng methanol và thử khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp pha loãng trong thạch (xác định nồng độ ức chế tối thiểu: MIC), sau khi trồng các cây trong cùng điều kiện đất, trên 8 chủng vi khuẩn Staphylococus aureus, Streptococcus faecalis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella spp, Aeromonas hydrophila, Edwardsiella ictaluri, Edwardsiella tarda. Kết quả đạt được:các mẫu Hẹ có sự đa dạng về di truyền DNA và chia làm 3 nhóm với khoảng cách liên kết dao động từ 1,000 đến 6,325. Cao Hẹ có khả năng ức chế trên tất cả các chủng vi khuẩn thí nghiệm (512 µg/ml ≤ MIC ≤ 4096 µg/ml). Các nhóm cây Hẹ tác động tốt nhất trên vi khuẩn Staphylococus aureus (nhóm Hẹ 1b và nhóm Hẹ 2 với MIC=512 µg/ml), kế đó là vi khuẩn Escherichia coli (nhóm Hẹ 3 với MIC= 1024 µg/ml) và vi khuẩn Streptococcus faecalis (nhóm Hẹ 1a với MIC= 1024 µg/ml).

1 GIỚI THIỆU

Cây Hẹ được dùng làm gia vị và làm thuốc. Theo kinh nghiệm dân gian, Hẹ thường được dùng chữa ho của trẻ em, hen suyễn nặng, đau cổ họng, sưng yết hầu, còn dùng chữa các bệnh kiết lỵ ra máu, làm thuốc bổ giúp trong tiêu hóa kém, mồ hôi trộm, tốt cho gan, thận, chữa bệnh di tinh, đi tiểu nhiều lần, tiểu ra máu, tiêu chảy, viêm mũi, viêm tai giữa, viêm tuyến tiền liệt. Lá Hẹ cũng hiệu quả trong điều trị lỵ amip. Theo tài liệu cổ, Hẹ có vị cay, ngọt, tính ôn vào hai kinh can và thận, có tác dụng bổ can thận, làm ấm lưng gối, dùng làm thuốc chữa tiểu tiện nhiều lần, đái són, đái dầm. Phòng Đông y thực nghiệm Viện vệ sinh dịch tễ trung ương đã xác định nước ép lá hẹ tươi và thành phần bay hơi của cây đều có tác dụng kháng khuẩn mạnh đối với *Streptococcus hemolyticus*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Shigella shiga*, *Coli bethesda*, *Bacillus subtilis* (Võ Văn Chi, 1999; Đỗ Tất Lợi, 2003). Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào cho biết sự thuần chủng của cây này. Để góp phần tìm hiểu về loại cây vừa là thức ăn vừa có tác dụng chữa bệnh này, nghiên cứu về sự thuần chủng và khả năng kháng khuẩn của cây Hẹ được thực hiện, từ đó hi vọng chọn lọc ra được cây có hoạt tính kháng khuẩn cao.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Địa điểm thu mẫu: cây Hẹ tại một số huyện thuộc tỉnh An Giang, Bến Tre, Đồng Tháp, Vĩnh Long, Cần Thơ được thu mẫu thực hiện phản 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.

Sử dụng các chủng vi khuẩn:

– 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

– 15 mẫu Hẹ được thu từ 15 nơi khác nhau (khoảng cách tối thiểu giữa 2 cây gần nhau nhất là 5 km).

– Tách chiết DNA tổng số theo phương pháp CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) (Dolye, 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 Arithmatic Mean) (Sneath and Sokal, 1973).

Bảng 1: Danh sách các RAPD primer được sử dụng cho thí nghiệm

STT	RAPD primer	Trình tự primer (5'……3')	STT	RAPD primer	Trình tự primer (5'……3')
1	OPA01	CAG GCC CTT C	11	OPA13	CAG CAC CCA C
2	OPA02	TGC CGA GCT G	12	OPB10	CTG CTG GGA C
3	OPA03	AGT CAG CCA C	13	OPD02	GGA CCC AAC C
4	OPA04	AAT CGG GCT G	14	OPD03	GTC GCC GTC A
5	OPA05	AGG GGT CTT G	15	OPE01	CCC AAG GTC C
6	OPA06	GGT CCC TGA C	16	OPE07	AGA TGC AGC C
7	OPA07	GAA ACG GGT G	17	OPE14	TGC GGC TGA G
8	OPA08	GTG ACG TAG G	18	OPE19	ACG GCG TAT G
9	OPA09	GGG TAA CGC C	19	OPE20	AAC GGT GAC C
10	OPA10	GTG ATC GCA G	20	OPG06	GTG CCT AAC C

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.

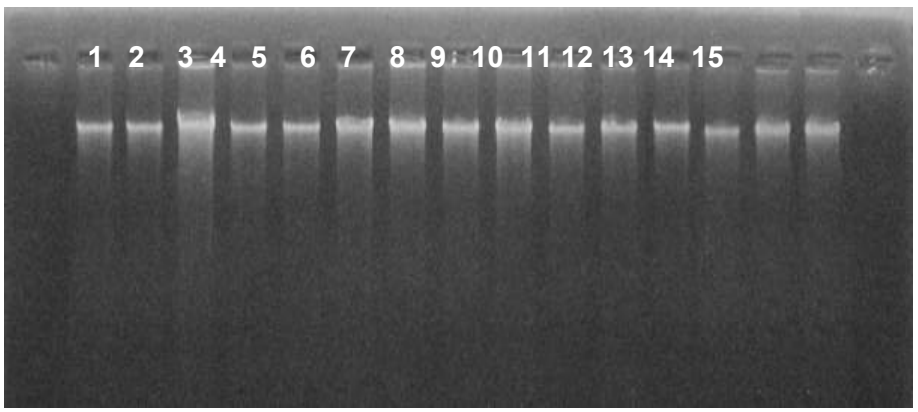
– Lá cây Hẹ được sấy khô và chiết bằng phương pháp ngâm dầm với methanol, loại bỏ dung môi bằng máy cô quay đến cắn, được cao thô, dùng thử tính kháng khuẩn, xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC (minimum inhibitory concentration) (Nguyễn Văn Đàn và Nguyễn Viết Tựu, 1985).

– 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, các mẫu DNA được kiểm tra qua gel agarose 1%, kết quả cho thấy tất cả các mẫu đều hiện băng rõ, có lẫn ít tạp chất, được thể hiện ở Hình 1.



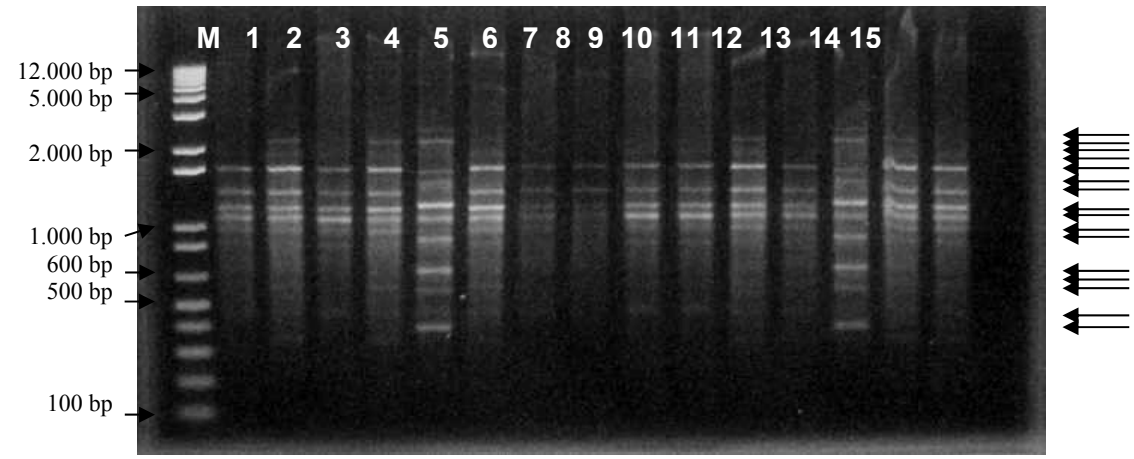
Hình 1: Kết quả điện di kiểm tra mẫu ly trích DNA của 15 mẫu cây Hẹ

1 - 15 Số thứ tự theo thứ tự cây mẫu

Để đánh giá sự đa hình của 15 mẫu cây Hẹ, 20 RAPD primer đã được sử dụng trong phản ứng PCR. Kết quả thu được từ phổ điện di có 7 primer chỉ ra băng rõ, xuất hiện trên tất cả 15 mẫu và đều cho kết quả đa hình. Tổng cộng có 59 băng được ghi nhận với trung bình trên một primer là 8,43 ± 4,24, trong đó có 49 băng đa hình chiếm tỉ lệ 80,05% với trung bình là 7 ± 4,55 băng đa hình trên mỗi primer. Primer cho số băng ít nhất là OPE14 với tổng số băng thu được là 3 (Hình 3) và primer OPD03 có tổng số băng cao nhất, số băng ghi nhận được là 17 băng (Hình 2). Primer OPE20 có tỉ lệ đa hình cao nhất (100%) và tỉ lệ đa hình thấp nhất ghi nhận được ở primer OPD02 (37,5%) (Bảng 2).

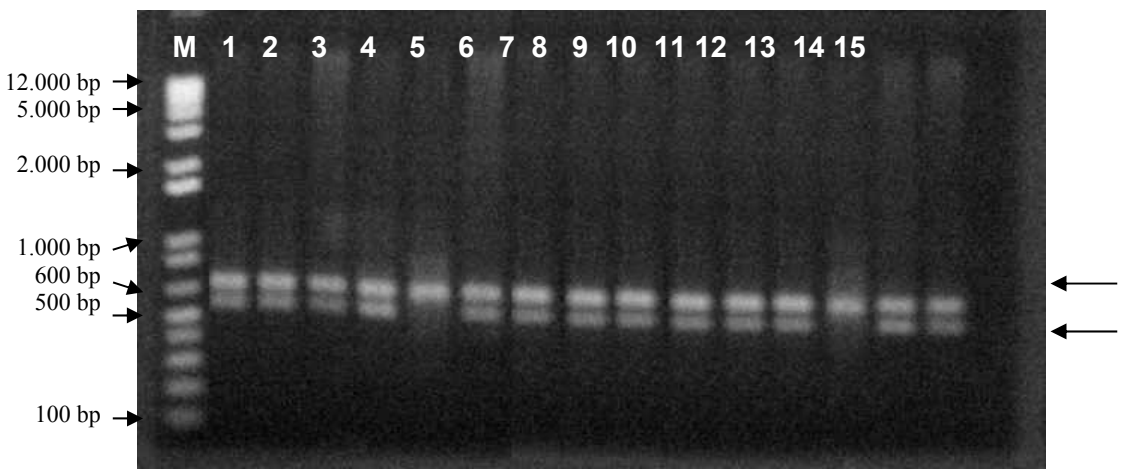
Bảng 2: Kết quả sự đa hình từ marker RAPD ở 15 mẫu cây Hẹ

TT	Primer	Trình tự primer (5' ……. 3')	Tổng số băng DNA	Số băng đa hình	Tỉ lệ đa hình (%)	Thứ tự băng đa hình
1	OPA13	CAGCACCCAC	9	8	88,9	1,2,3,5,6,7,8,9
2	OPB10	CTGCTGGGAC	8	7	87,5	2,3,4,5,6,7,8
3	OPD02	GGACCCAACC	8	3	37,5	1,3,6
4	OPD03	GTCGCCGTCA	17	16	94,1	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
5	OPE01	CCCAAGGTCC	7	6	85,7	1,2,4,5,6,7
6	OPE14	TGCGGCTGAG	3	2	66,7	1,3
7	OPE20	AACGGTGACC	7	7	100,0	1,2,3,4,5,6,7
		Tổng cộng	59	49		
		Trung bình	8,43	7	80,05	
		± SD	4,24	4,55		



Hình 2: Phổ điện di của primer OPD03

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 OPE14

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

Từ kết quả phân tích hình ảnh điện di sản phẩm RAPD, xác định khoảng cách di truyền giữa các mẫu Hẹ nghiên cứu thông qua sơ đồ hình nhánh. Kết quả sơ đồ hình nhánh (Hình 4) tạo được khi phân tích 15 mẫu Hẹ, có thể chia Hẹ làm 3 nhóm chính:

Nhóm 1

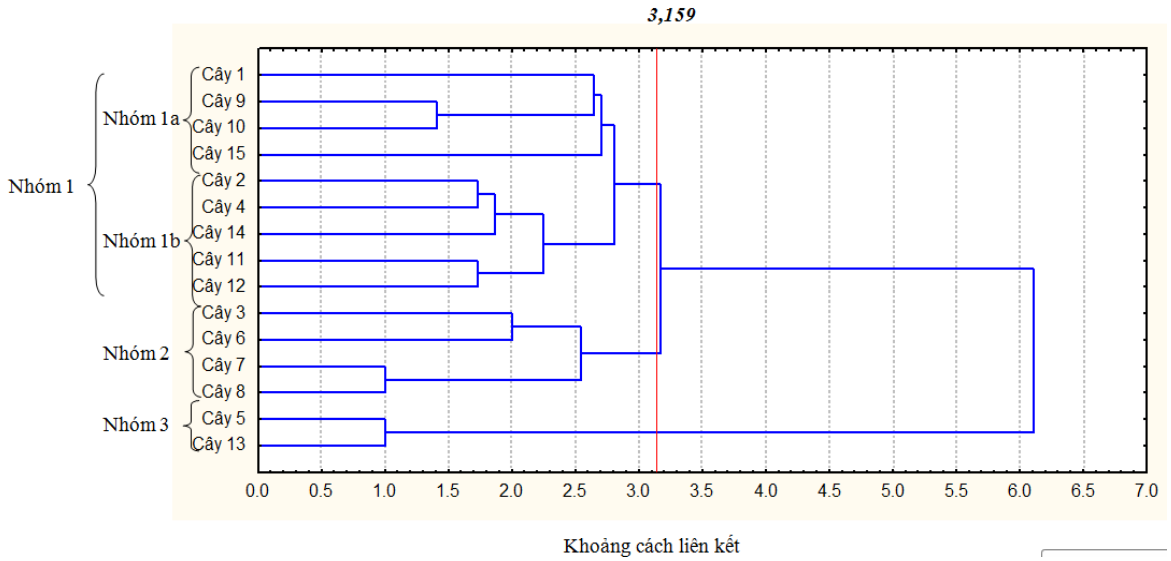
Nhóm 1a: gồm các mẫu 1, 9, 10, 15

Nhóm 1b: gồm các mẫu 2, 4, 14, 11, 12.

Nhóm 2: các mẫu 3, 6, 7, 8.

Nhóm 3: các mẫu 5, 13

Qua kết quả phân tích từ marker RAPD, cho thấy 15 mẫu Hẹ được nghiên cứu có sự đa dạng về mặt di truyền, với khoảng cách liên kết dao động tương đối cao trong khoảng 1,000 đến 6,325.



Hình 4: Sơ đồ hình nhánh thể hiện mối quan hệ giữa 15 cây Hẹ

3.2 Thử tính kháng khuẩn

Các cây Hẹ có sự khác biệt di truyền được trồng lại trong cùng điều kiện chăm sóc, dinh dưỡng. Sau 6 tháng các nhóm cây này được thử tính kháng khuẩn, kết quả trình bày qua Bảng 3.

Bảng 3: Nồngđộ ức chế tối thiểu của các nhóm Hẹ (µg/ml)

Nhóm	*Vi khuẩn*							
	S. aureus	***S. faecalis***	***E. coli***	***Sal. spp.***	***P. aeruginosa***	***A. hydrophila***	***E. ictaluri***	***E. tarda***
Hẹ1a	4096	1024	4096	4096	4096	4096	4096	4096
Hẹ1b	512	4096	4096	4096	4096	4096	4096	4096
Hẹ 2	512	4096	4096	4096	4096	4096	2048	4096
Hẹ 3	4096	4096	1024	4096	4096	2048	2048	4096

Qua Bảng 3 cho thấy:

Các nhóm cây Hẹ đều có khả năng ức chế trên 8 chủng vi khuẩn thí nghiệm, tuy nhiên khả năng kháng khuẩn khác nhau và trong cùng nhóm cũng có sự khác biệt. Ức chế tốt nhất trên vi khuẩn *Staphylococcus aureus* (nhóm Hẹ 1b và 2 với MIC = 512 µg/ml), kế đến vi khuẩn *Streptococcus faecalis* (nhóm Hẹ 1a với MIC = 1024 µg/ml) và vi khuẩn *Escherichia coli* (nhóm Hẹ 3 với MIC = 1024 µg/ml), trên *Aeromonas hydrophila* (nhóm Hẹ 3 với MIC = 2048 µg/ml) và *E. ictaluri* (nhóm Hẹ 2 và 3 với MIC = 2048 µg/ml) khả năng ức chế yếu hơn và thấp nhất trên vi khuẩn *Salmonella* spp., *E. tarda*, *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 4096 µg/ml).

Kết quả cho thấy Hẹ 1b và 2 có khả năng ức chế mạnh trên *S. aureus*. Đây là loại vi khuẩn sinh mủ điển hình, gây chứng viêm có mủ, một số trường hợp chuyển sang chứng huyết nhiễm mủ và bại huyết. Theo Anakalo Shitandi và Milcah Mwangi (2004), *S. aureus* kháng thuốc cao với penicillin (89,4%), kế tiếp là tetracycline (82,4%), trimethoprim-sulfamethazine (80,6%), chloramphenicol (64,8%), erythromycin (38,4%) và methicilin (35,9%). Hẹ 1a cũng tác động tốt trên *Escherichia coli*, vi khuẩn gây bệnh đường ruột cho ngựa, bê, cừu, heo con, gia cầm non và rất khó điều trị và tính kháng thuốc của các chủng vi khuẩn này ngày càng cao. Hiện nay, *E.coli* đa kháng một lúc với nhiều loại kháng sinh, phổ biến có 12% đa kháng với 7 loại kháng sinh, 32% đa kháng với 6 loại kháng sinh, 40% đa kháng với 5 loại kháng sinh, 10% đa kháng với 4 loại kháng sinh, 6% đa kháng với 3 loại kháng sinh (Lê Văn Tạo, 2006). Hẹ 3 cũng tác động tốt trên *E. faecalis* gây viêm có mủ ở phủ tạng, viêm họng, gây viêm da kế phát, mẫn đỏ và cũng đã kháng nhiều nhóm kháng sinh như gentamycin, augmentin, streptomycin và ceftriazone (Adejuwon *et al*., 2010).

Theo Đỗ Tất Lợi (2003), trong hẹ có chứa hoạt chất odonin có tác dụng kháng khuẩn ức chế mạnh

vi khuẩn *Staphylococcus aureus* và *Bacillus coli*, nước ép của hẹ cũng có tính kháng khuẩn rất cao đối với nhiều loại vi khuẩn: *Salmonella typhi* (đường kính vòng vô khuẩn 1 cm), *Staphylococcus* (đường kính vòng vô khuẩn 1 cm), *Shigella flexneri* và *subtilis* (đường kính vòng vô khuẩn 0,8 cm), *Coli bethesda* và *Coli pathogéne* (đường kính vòng vô khuẩn 0,6 cm). Tính chất kháng sinh này khá bền vững: nước cốt ép của hẹ, ly tâm để bỏ cặn, lấy nước trong, hấp Tyndall để lâu vẫn giữ được tính kháng sinh. Tính chất kháng sinh của hẹ chỉ mất một ít sau khi chịu tác dụng của pepsin (để trong môi trường pH 1,4-2; ở tủ ấm 37^{o}C sau 4 giờ).

Bên cạnh đó, theo Bùi Thị Tho (2003) trong tự nhiên phytoncid của Hẹ không bị vi khuẩn kháng lại và trong điều kiện phòng thí nghiệm khả năng vi khuẩn kháng lại phytoncid khó hơn các thuốc hóa trị liệu và không có sự kháng chéo giữa phytoncid và các thuốc hóa trị liệu.

Việc phát hiện tính kháng khuẩn của Hẹ 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 động vật thủy sinh và gia súc thay thế kháng sinh hóa dược đang bị kháng thuốc, hạn chế sử dụng kháng sinh gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người và môi sinh.

4 KẾT LUẬN

Thông qua các dữ liệu của phương pháp RAPD cho thấy Hẹ không thuần chủng mà gồm 3 nhóm. Hẹ có khả năng ức chế trên tất cả các chủng vi khuẩn thí nghiệm (512 µg/ml ≤ MIC ≤ 4096 µg/ml). Các nhóm Hẹ tác động tốt nhất trên vi khuẩn *Staphylococus aureus* (nhóm Hẹ 1b và nhóm Hẹ 2 với MIC=512 µg/ml), kế đến *Escherichia coli* (nhóm Hẹ 3 với MIC= 1024 µg/ml) và *Streptococcus faecalis* (nhóm Hẹ 1a với MIC= 1024 µg/ml).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adejuwon, A. O., M. A. Bisi-Johnson., F. T Olarewaju and O. A Agboola, 2010.Antibiotics resistance of a strain of treptococcus faecalis isolated from sewage oxidation pond. Department of Biochemistry and Microbiology. 2(11): 364-366.
2. Anakalo Shitandi and Milcah Mwangi, 2004. Occurrence of multiple antimicrobial resistance among S. aureus isolates from Kenyan milk. The Journal of Food Technology in Sfrica.
3. Bùi Thị Tho, 2003. Thuốc kháng sinh và nguyên tắc sử dụng trong chăn nuôi. NXB Hà Nội.
4. Đỗ Tất Lợi, 2003. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Y học.
5. 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.
6. Lê Văn Tạo, 2006. Bệnh do Escherichia coli gây ra ở lợn. Khoa học kỹ thuật thú y. 8(3): 75-84.
7. Nguyễn Văn Đàn và Nguyễn Viết Tựu, 1985. Phương pháp nghiên cứu hóa học cây thuốc. Thành phố Hồ Chí Minh. NXB Y học.
8. Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal, 1973. Numerical taxonomy.Freeman. San Francisco. p.573.
9. Trương Công Quyền và ctv, 1986. Thực hành dược khoa. NXB Y học.
10. Từ Minh Koóng và ctv, 2001. Kỹ thuật sản xuất dược phẩm Tập I. Đại học Dược Hà Nội.
11. Võ Văn Chi, 1999. Từ điển cây thuốc Việt Nam. NXB Y học.