

cũng như thể tích của gradient NaCl và thể tích thu các phân đoạn;

- Phụ thuộc vào ĐPGPT của cột CM-cellulose mà RNase nọc rắn hổ mang có thể phân tách ra được thành 2 – 5 đỉnh khác nhau về điện tích bề mặt;

- Đỉnh RNase ra khỏi cột CM-cellulose sau

cùng trong đa số các lần tách chiết, có thể được làm sạch tiếp để phục vụ cho các mục đích nghiên cứu khác nhau.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của nhiệm vụ HTQT cấp Viện Hàn lâm KHCNVN với Quỹ NCCB Nga, mã số: VAST.HTQT.NGA.07/15-16.

Tài liệu tham khảo

1. Babkina G. T., Vasilenko S. K. (1964), Нуклеазная активность ядов средне-азиатских змей, *Биохимия*, 29(2), 268-272.
2. Kochetov G. A. (1980), Практическое руководство по энзимологии, Издательство Высшая Школа, Москва, 272 стр.
3. Mahalakshmi Y. V., Jagahnadham M. V., Pandit M. W. (2000), Ribonuclease from cobra snake venom: Purification by affinity chromatography and further characterization, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 49(4), 309-316.
4. Nguyễn Văn Thiết (2002), Nghiên cứu hoạt tính ribonucleolytic của nọc rắn hổ mang, *Tạp chí Dược liệu*, 7(6), 181-185.
5. Nguyễn Văn Thiết, Nguyễn Hoàng Tinh (2002), Nghiên cứu một số tính chất của ribonuclease từ nọc rắn hổ mang đen (*Naja naja*), *Báo cáo Hội nghị khoa học Hội Hóa sinh Y Dược Hà Nội và các tỉnh phía Bắc*, Đồ Sơn – Hải Phòng, 2-3/8/2002, tr. 82-92.
6. Nguyễn Văn Thiết, Ngô Thị Hải Yến (2003), Một số tính chất đặc trưng của ribonuclease từ nọc rắn hổ mang đen Việt Nam (*Naja naja*), *Báo cáo Hội nghị khoa học toàn quốc lần II “Những vấn đề Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Nghiên cứu cơ bản trong Sinh học, Nông nghiệp, Y học”*, Huế, 25-26/7/2003. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, 2003, 515-518.
7. Nguyễn Văn Thiết (2003), Tính đa hình phân tử của ribonuclease từ nọc rắn hổ mang đen. I – Hai dạng động học, *Tạp chí Dược liệu*, 8(6), 167-170.
8. Nguyễn Văn Thiết, Ngô Thị Hải Yến (2004), Tính đa hình phân tử của ribonuclease từ nọc rắn hổ mang đen. II - Các dạng sắc ký, *Tạp chí Dược liệu*, 9(3), 89-93.
9. Nguyễn Văn Thiết, Giang Thái Sơn (2006), Kết quả tách enzyme ribonucleaza từ nọc rắn hổ mang bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion trên cột CM-xen-lu-lô, *Tạp chí Sinh học*, 28(3), 83-87.
10. UNICORN version 3.10, User Manual. Amersham Pharmacia Biotech (1999), Part Methods and Runs, 10. Evaluating results. Peak Skimming, p.10-7.
11. Vasilenko S. K., Babkina G. T. (1965), Выделение и свойства нуклеазы из яда кобры, *Биохимия*, 30(4), 705-712.

Tạp chí Dược liệu, tập 21, số 1+2/2016 (Trang 116 - 120)

NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT NHÂN GIỐNG IN VITRO CÂY HÚNG CHANH ẨM ĐỘ

Tạ Như Thục Anh, Nguyễn Thị Duyên, Dương Thị Phúc Hậu
Trung tâm Nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội, Viện Dược liệu*

*Email: tnthucanh@gmail.com

(Nhận bài ngày 22 tháng 10 năm 2015)

Tóm tắt

Húng chanh Ẩm Độ (*Coleus forskohlii* Briq.) thuộc họ Bạc hà (Lamiaceae), là một trong những cây thuốc quan trọng mang lại những giá trị cao trong ngành công nghiệp dược phẩm Ấn Độ. Rễ của cây chứa forskolin, đây là hợp chất thuộc nhóm diterpenoid có tác dụng chữa một số bệnh như: tăng huyết áp, tăng nhãn áp, hen-suyễn, suy tim sung huyết và một số bệnh ung thư. Đốt thân mang mắt ngủ có kích thước 1,5-2,0 cm được sử dụng tạo nguồn nguyên liệu khởi đầu trong nuôi cấy *in vitro*. Môi trường tốt nhất cho nhân nhanh cụm chồi là: MS + 0,25 ml/l kinetin + 0,125 mg/ BA + 30 g/l đường. Môi trường tạo rễ cây hoàn chỉnh: MS + 0,5 mg/l α -NAA + 30 g/l đường hoặc MS + 0,5 mg/l IBA + 30 g/l đường.

Từ khóa: *Coleus forskohlii* Briq., Nhân nhanh, Đoạn thân mang mắt ngủ.

Summary

Research on the Micropropagation of *Coleus forskohlii* Briq.

Coleus forskohlii Briq. belong to the family Lamiaceae. It is an important and valuable medicinal plant which assumes greater interest in the Indian drug industry. The roots of *C. forskohlii* Briq are rich source of forskolin, a diterpenoid which

has been used to treat many diseases such as hypertension, glaucoma, asthma, congestive heart failure and some types of cancers. Using *in vitro* propagation of *Coleus forskohlii* Briq showed that the nodal stems in size 1.5-2.0 cm was used to create beginning material in tissue culture medium. The best medium for rapid propagation of shoot was MS + 0.25 mg/l Kinetin + 0.125 mg/ BA + 30 g/l sucrose. The rooting medium was MS + 0.5 mg/l α -NAA + 30 g/l sucrose or MS + 0.5 mg/l IBA + 30 g/l sucrose.

Keywords: *Coleus forskohlii* Briq., Rapid propagation, Nodal stems.

1. Đặt vấn đề

Húng chanh Ấn Độ (*Coleus forskohlii* Briq.) thuộc họ Lamiaceae là một trong những cây thuốc quan trọng của nền công nghiệp dược Ấn Độ. Chi *Coleus* gồm 150 loài nhưng chỉ có loài *C. forskohlii* là có hoạt chất forskohlii [7]. Hoạt chất forskohlii trong rễ được sử dụng để điều trị eczema, hen suyễn, bệnh vẩy nến, rối loạn tim mạch và cao huyết áp, đây là nguồn forskolin diterpenoid duy nhất trong tự nhiên [2,8]. Y học hiện đại cho biết húng chanh Ấn Độ có tiềm năng sử dụng lớn trong chữa trị bệnh glucan, bệnh lý tim mạch và còn sử dụng trong điều trị một số dạng ung thư [1,6].

Cây húng chanh Ấn Độ mới được di thực về Việt Nam với mục đích nghiên cứu trồng và phát triển thành mặt hàng dược liệu xuất khẩu. Húng chanh Ấn Độ có thể nhân giống bằng phương pháp hữu tính từ hạt hoặc vô tính bằng giâm cành. Tuy nhiên, trong sản xuất người ta chỉ sử dụng phương pháp nhân giống vô tính. Biện pháp nhân giống này được dễ dàng thực hiện ở Ấn Độ, là nơi xuất xứ của giống, cũng như một vài nơi trên thế giới đã di thực và sản xuất thành công cây này.

Ở Việt Nam, thời vụ trồng húng chanh Ấn Độ thích hợp vào tháng 11 năm trước đến tháng 4 năm sau. Thời gian giữ giống và nhân giống rơi vào những tháng có lượng mưa lớn hơn 54mm nên gặp rất nhiều khó khăn trong khâu sản xuất giống. Để cung cấp một lượng giống lớn, đúng thời vụ sản xuất vẫn chưa tìm được giải pháp thích hợp. Vì vậy, chúng tôi đã nghiên cứu kỹ thuật "nhân nhanh *in vitro* cây húng chanh Ấn

Độ", đây có thể là một giải pháp hữu hiệu nhằm cung cấp đủ cây giống phục vụ sản xuất dược liệu vào thời vụ thích hợp.

2. Nguyên liệu, phương pháp nghiên cứu

Mẫu nuôi cấy là chồi đỉnh và đốt thân có chứa từ một đến hai mắt ngủ, có chiều dài từ 1,5 - 2 cm, rửa dưới vòi nước chảy trong 15 phút cho sạch sau đó khử trùng bằng $HgCl_2$ nồng độ 0,1 % trong 8-10 phút. Toàn bộ thao tác khử trùng được tiến hành trong điều kiện vô trùng. Chồi sau khi khử trùng được đưa vào nuôi cấy ở môi trường Murashige & Skooge (1962) (MS) 30% đường, có bổ sung cytokinin và auxin theo các tỷ lệ khác nhau, pH môi trường chỉnh đến 5,8 và hấp vô trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong 20 phút. [3,4,5]. Phòng nuôi cấy có quang chu kỳ 14 giờ sáng/10 giờ tối, cường độ chiếu sáng 2000 lux, nhiệt độ là $25 \pm 2^\circ C$. Môi trường MS không có chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng làm đối chứng. Các số liệu về chỉ tiêu theo dõi được đo đếm sau 6 tuần nuôi cấy.

3. Kết quả và thảo luận

Tạo nguyên liệu sạch

Việc khử trùng và tạo nguồn nguyên liệu sạch là một trong những khâu quan trọng của quá trình nhân giống *in vitro*. Loại chồi sử dụng làm nguyên liệu đầu vào cũng ảnh hưởng nhất định đến hiệu quả khử trùng. Trong thí nghiệm, chúng tôi đã sử dụng chồi nách, chồi đỉnh và đốt thân với các kích thước khác nhau làm nguyên liệu vào mẫu. Kết quả cho thấy ở cùng chế độ khử trùng, chồi nách, chồi đỉnh và đốt thân có phản ứng khác nhau và cho kết quả ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của loại chồi đến tỷ lệ sống, sinh trưởng và tái sinh chồi cây húng chanh *in vitro*

STT	Loại chồi	Chiều dài mẫu cây (cm)	Tỷ lệ sống (%)	Hệ số nhân chồi (lần)	Đặc điểm chồi mới
1	Chồi ngọn	0,5-1,0	34	$1,3 \pm 0,12$	Chồi kéo dài
2		1,0-1,5	46	$1,2 \pm 0,11$	Chồi kéo dài
3		1,5-2,0	51	$1,3 \pm 0,14$	Chồi kéo dài
4		0,5-1,0	30	$1,5 \pm 0,12$	Chồi kéo dài

5	Chồi nách	1,0-1,5	35	1,5± 0,10	Chồi kéo dài
6		1,5-2,0	40	1,5± 0,15	Chồi kéo dài
7	Đốt thân	0,5-1,0	50	2,1± 0,18	Chồi nách
8		1,0-1,5	58	2,1± 0,15	Chồi nách
9		1,5-2,0	62	2,2± 0,16	Chồi nách

Các kết quả cho thấy: So sánh với công thức sử dụng mẫu đưa vào là đốt thân, cả hai loại công thức chồi nách và chồi đỉnh đều có tỷ lệ sống thấp hơn chỉ đạt 40 - 51%, trong khi khử trùng đốt thân tỷ lệ sống đạt 62%. Bên cạnh đó, số chồi/mẫu cây cũng nhiều nhất và đạt 2,2 chồi/mẫu cây. Kích thước của mẫu cây cũng ảnh hưởng tới tỷ lệ sống của mẫu cây, nhưng hầu như không ảnh hưởng tới hệ số tái sinh chồi. Như vậy, trong giai đoạn tạo nguyên liệu sạch, rõ ràng kích thước chồi và loại chồi có ảnh hưởng đến tỷ lệ sống và hệ số nhân chồi của húng chanh Ấn Độ.

Có thể kết luận, nên sử dụng đốt thân húng chanh Ấn Độ có kích thước từ 1,5 đến 2 cm tạo nguyên liệu sạch.

Húng chanh Ấn Độ là loài thân thảo, có khả năng tái sinh cây từ các đốt thân, vì vậy, ngoài

việc nhân chồi theo hướng tạo cụm chồi, việc kéo dài thân, làm tăng số đốt từ đó cắt đốt để tạo cây tăng hệ số nhân là một trong những hướng nhân nhanh cây húng chanh *in vitro*. Các chồi tái sinh trong giai đoạn này là đoạn thân kéo dài từ chồi đỉnh và chồi nách, còn mầm ngủ nằm ở đốt thân sẽ phát triển thành chồi.

Nghiên cứu nhân nhanh

+Ảnh hưởng của nhóm cytokinin riêng rẽ đến khả năng tái sinh chồi.

Cytokinin là nhóm các hợp chất adenin, có khả năng điều tiết sự phân chia và giãn nở tế bào. Các chồi được cấy chuyển vào môi trường nuôi cấy có bổ sung 2 loại cytokinin là kinetin và BA theo dải nồng độ từ 0,1 đến 0,5 mg/l. Kết quả thí nghiệm được thu thập sau 6 tuần nuôi cấy và được tóm tắt trong Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của cytokinin riêng rẽ đến sự tái sinh chồi *in vitro* của cây húng chanh Ấn Độ

TT	Chỉ tiêu theo dõi	Chiều cao (cm)	Hệ số nhân (lần)	Trạng thái
1	Công thức MS	4,81 ± 0,23	2,12 ± 0,43	+++
2	MS + 0,1 mg/l BA	3,71 ± 0,33	2,75 ± 0,42	+++
3	MS + 0,3 mg/l BA	3,11 ± 0,35	2,85 ± 0,63	++
4	MS + 0,5 mg/l BA	2,65 ± 0,26	3,21 ± 0,51	+
5	MS + 0,1 mg/l Kín	3,41 ± 0,25	2,13 ± 0,33	+++
6	MS + 0,3 mg/l Kín	3,01 ± 0,31	2,62 ± 0,65	++
7	MS + 0,5 mg/l Kín	2,85 ± 0,25	2,95 ± 0,51	+

Qua bảng trên, chúng tôi nhận thấy: khi bổ sung kinetin ở các nồng độ từ 0,1mg/l đến 0,5mg/l hệ số nhân chồi tăng dần và cao hơn so với đối chứng, chiều cao của chồi giảm theo chiều tăng của nồng độ xử lý. Hệ số nhân chồi (HSNC) cao nhất đạt được 2,95 lần khi tăng tới nồng độ kinetin là 0,5 mg/l. Chỉ tiêu về chiều cao chồi giảm dần, điều này chứng tỏ bên cạnh tác dụng kích thích phát sinh chồi, kinetin còn gây ức chế kéo dài thân, làm giảm chiều cao cây.

Khác với kinetin, tác động của BA đến hệ số nhân chồi biểu hiện rõ rệt và mạnh mẽ hơn hẳn. Trong dải nồng độ từ 0,1mg/l đến 0,5mg/l,

HSNC tăng lên tỷ lệ thuận với nồng độ BA và hệ số này đạt cao nhất là 3,21 ở công thức 4. Tuy nhiên, ở công thức này chiều cao các chồi được tạo ra thấp nhất, với chiều dài chồi là 2,65cm thấp hơn 1,8 cm so với đối chứng. Đặc biệt, ở nồng độ 0,5mg/l, mô sẹo bắt đầu xuất hiện ở phần tiếp xúc với thạch. Cũng như với kinetin, bổ sung BA ở nồng độ cao đã làm cân bằng phytohooemon nghiêng về hình thành mô sẹo, ức chế sinh trưởng chồi.

Như vậy, cả BA và kinetin ở nồng độ 0,5 mg/l, khi được bổ sung riêng rẽ vào môi trường đều cho hệ số nhân chồi cao nhất và cao hơn so với môi trường không có chất sinh trưởng.

+ Ảnh hưởng của tổ hợp cytokinin đến hệ số nhân chồi húng chanh Ấn Độ.

Nhìn chung, các chất sinh trưởng được xếp vào cùng một nhóm thì có thể gây ra các phản ứng sinh lý tương tự nhau. Tuy thế, tùy theo từng chất mà nó có thể có tác động lên đối tượng theo những con đường riêng, ở mức độ phân tử khác nhau trong mô hình biểu hiện kiểu gen, phụ thuộc vào môi trường tác động đặc trưng giữa các chất này và tế bào. Vì vậy, nghiên cứu tổ hợp các chất có thể tạo ra hiệu quả mới so với sử dụng riêng lẻ từng chất.

Kết quả cho thấy sử dụng kết hợp BA và kinetin cho hiệu quả cao hơn, hệ số nhân chồi cao hơn nhiều so với đối chứng và cũng cao hơn so với các công thức trước đó khi sử dụng riêng lẻ các cytokinin.

Ở CT1, nồng độ 0,125 mg/l BA và kinetin cân bằng nhau, hệ số nhân giống tăng 5,25 chồi/mẫu so với 2,12 chồi/mẫu trong môi trường đối chứng. Khi cố định ở nồng độ BA 0,125 mg/l, kết

hợp với kinetin ở các nồng độ lần lượt là 0,25(CT2) và 0,5 mg/l(CT3), hệ số nhân chồi tương ứng đạt 15,52 chồi/mẫu và 9,85 chồi/mẫu. Như vậy, tổ hợp 0,125 mg/lBA và 0,25 mg/lKin đã thiết lập cân bằng chất điều tiết sinh trưởng ở ngưỡng thích hợp, kích thích hình thành chồi cao nhất. Tiếp tục khi nồng độ Kin tăng tới 0,5 mg/l, tổ hợp với 0,125 mg/lBA, số lượng chồi lại giảm đi còn là 9,85 chồi/mẫu, điều này chứng tỏ quá trình nhân chồi bắt đầu bị ức chế do nồng độ chất sinh trưởng cao hơn đã phá vỡ cân bằng ở ngưỡng kích thích.

Trong công thức nồng độ kinetin không đổi là 0,125mg/l, hệ số nhân chồi tăng lên khi kết hợp với nồng độ BA trong dải nồng độ từ 0,25mg/l đến 0,5 mg/l, hệ số nhân chồi đạt 4,25 trong công thức 4 và 5,53 ở CT5.

Có thể kết luận rằng tổ hợp 0,25mg/l kinetin kết hợp với 0,125 mg/l BA có tác động kích thích bật chồi mạnh nhất đối với chồi húng chanh Ấn Độ.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp kinetin và BA đến tới sinh trưởng của cây húng chanh Ấn Độ *in vitro* (sau cấy 30 ngày)

Công thức	Tổ hợp ĐHST		Chỉ tiêu theo dõi	
	Kinetin (mg/l)	BA (mg/l)	Số chồi/cây (cái)	Chiều cao (cm)
ĐC	0,0	0,0	2,12 ± 0,43	4,11 ± 0,23
CT1	0,125	0,125	5,25 ± 0,16	5,52 ± 0,35
CT2	0,25		15,52 ± 1,28	4,45 ± 0,52
CT3	0,5		9,85 ± 1,42	4,42 ± 0,12
CT4	0,125	0,25	4,25 ± 0,28	3,88 ± 0,27
CT5		0,5	5,53 ± 0,52	4,75 ± 0,29

Nghiên cứu tạo rễ và cây hoàn chỉnh

Khi chồi đạt chiều cao từ 3 - 4 cm được chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh.

Cây húng chanh Ấn Độ có thể ra rễ trên môi trường không chất điều hòa sinh trưởng, tuy nhiên để có thể chủ động cây ra rễ đồng loạt, chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của nhóm auxin tới tỷ lệ ra rễ của húng chanh *in vitro*. Môi trường được bổ sung α -NAA hoặc IBA ở các nồng độ từ 0,1 đến 0,5 mg/l. Kết quả được biểu hiện ở Bảng 4.

Như vậy, cả hai chất α -NAA và IBA đều có

tác dụng kích thích hình thành rễ ở chồi húng chanh *in vitro*. Tỷ lệ ra rễ ở các công thức có bổ sung auxin cao hơn môi trường không điều tiết sinh trưởng và đạt 100% cây ra rễ sau 10 ngày. Số lượng rễ ở các công thức tăng dần theo hướng tăng nồng độ, cao nhất ở nồng độ 0,5 mg/l của cả hai chất thuộc nhóm auxin, đạt 5,9 và 6,8 rễ/cây. Ngược lại với số rễ, chiều dài rễ lại tỷ lệ nghịch với chiều tăng nồng độ chất kích thích sinh trưởng, chiều dài giảm còn 4,2 cm và 3,8 cm ở nồng độ 0,5 mg/l α -NAA và IBA tương ứng.

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất sinh trưởng IBA và α -NAA tới sinh trưởng của rễ húng chanh Ấn Độ *in vitro*

STT	Môi trường	Chỉ tiêu theo dõi	Tỷ lệ ra rễ sau 10 ngày (%)	Số rễ /cây (cái)	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng
1	MS		80	4,8 ± 0,82	8,2 ± 0,21	+++
2	MS + 0,1mg/l α -NAA		92	5,5 ± 0,98	5,8 ± 0,18	+++
3	MS + 0,3mg/l α -NAA		95	5,8 ± 0,86	4,6 ± 0,22	++

4	MS + 0,5mg/l α -NAA	100	$5,9 \pm 0,21$	$4,2 \pm 0,25$	-
5	MS + 0,1mg/l IBA	94	$5,4 \pm 0,82$	$5,1 \pm 0,18$	+++
6	MS + 0,3mg/l IBA	96	$6,3 \pm 0,46$	$4,9 \pm 0,15$	+
7	MS + 0,5mg/l IBA	100	$6,8 \pm 0,24$	$3,8 \pm 0,02$	-

Chú thích: +++ rễ khỏe; ++ rễ trung bình; -rễ kém chất lượng.

Hoạt tính kích thích của α -NAA rõ ràng thấp hơn hoạt tính của IBA, ở cùng nồng độ xử lý nhưng ở các công thức chứa IBA tỷ lệ ra rễ cũng như số rễ/cây đều cao hơn công thức có α -NAA.

4. Kết luận

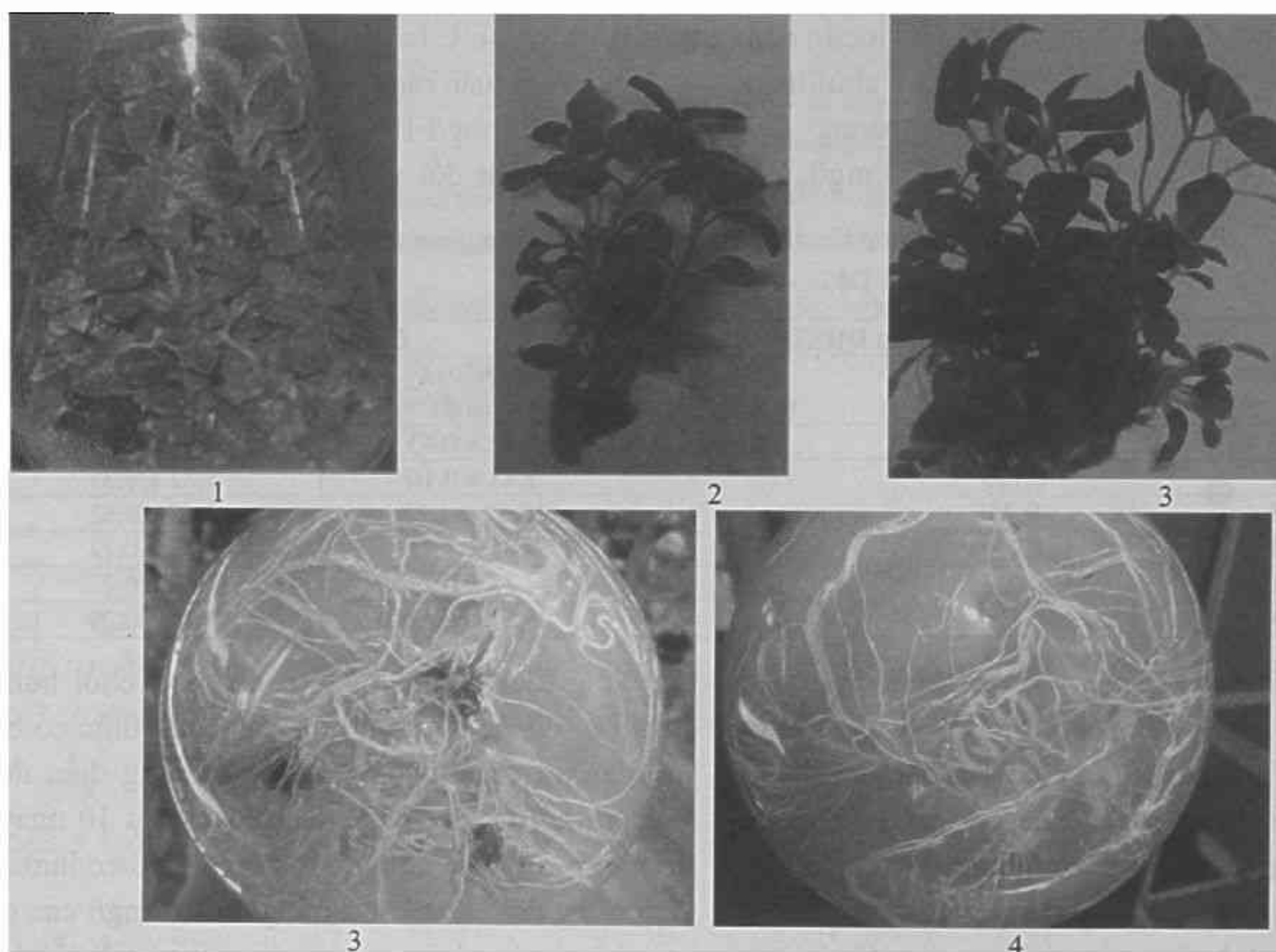
Sử dụng đốt thân húng chanh Ấn Độ có kích thước từ 1,5 đến 2 cm để tạo nguyên liệu sạch là tốt nhất, tỷ lệ sống đạt 62%, hệ số nhân đạt 2,2 lần.

Hiệu quả kích thích hình thành chồi của BA và kinetin khi bổ sung riêng rẽ vào môi trường

MS thấp hơn tổ hợp của hai chất này.

Tổ hợp 0,25mg/l kinetin kết hợp với 0,125 mg/l BA có tác động kích thích bật chồi mạnh nhất đối với chồi húng chanh Ấn Độ, được sử dụng để nhân nhanh chồi húng chanh Ấn Độ.

Cả α -NAA và IBA đều có tác dụng kích thích hình thành rễ ở chồi húng chanh Ấn Độ *in vitro*, cao nhất ở nồng độ 0,5 mg/l. Tuy nhiên, do chất lượng rễ kém nên trong sản xuất chỉ sử dụng chúng ở nồng độ 0,1mg/l để tạo cây hoàn chỉnh khi đưa ra ngoài sản xuất.



Tài liệu tham khảo

1. Bodiwala H. S., Sabde S., Mitra D., Bhutani K. K., Singh I. P. (2009), Anti-HIV diterpenes from *Coleus forskohlii*, *Natural Product Communications*, 4(9), 1173-5.
2. De Souza N. J., Dohandwalla A. N. and Rupp R. H. Eds., (1986) Forskolol: its chemical, biological and medicinal potential. *Hoechst India Limited*, 77.
3. Kavitha C., Rajamani K. Vadivel E. (2010), *Coleus forskohlii*: A comprehensive review on morphology, phytochemistry and pharmacological aspects, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(4), 278 – 285.
4. Murashige T., Skoog F. (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiology Plant*, 15, 473-497.
5. Rajasri B., Sabita B. (2001), *In vitro* multiplication of *Coleus forskohlii* Briq.: An approach towards shortening the protocol, *In vitro cellular & developmental biology – Plant*, 37, 572-575.
6. Shah V., Bhat S. V., Bajwa B. S. (1980), The occurrence of forskolin in Labiatae, *Planta Medica*, 39, 183-185.
7. Shah V. (1996), *Coleus forskohlii* Briq. – An overview. In: *Supplement to Cultivation and Utilisation of Medicinal Plants*. Eds. Handa S. S. and Kaul M.K., RRL, Jammu T., 385-412.
8. Saha S. et al. (2010), Micropropagation of an important medicinal plant *Coleus forskohlii* Briq., *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 436- 444.