

NGHIÊN CỨU TẠO RỄ *IN VITRO* VÀ GIÁ THỂ NGOÀI VƯỜN ƯƠM CỦA CÂY RÂU MÈO (*Orthosiphon aristatus*)

Thongkham LAPHASY¹, Phạm Thị Thanh Nhân^{*2}

¹Trường Cao đẳng Sư phạm Khangkhay, tỉnh Xiengkhoang, Lào

²Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Cây Râu mèo hay cây Bông bạc (*Orthosiphon aristatus*) là vị thuốc Đông y có tác dụng điều trị bệnh sỏi thận, hạ đường huyết, chữa viêm thận cấp tính và mãn tính, thống phong, thấp khớp, viêm gan, đái tháo đường, chống lại tế bào ung thư... Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhóm chất auxin và giá thể đến khả năng tạo rễ và cây Râu mèo hoàn chỉnh nhập từ Lào nhằm góp phần xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* để phát triển loài cây này ở Việt Nam. Công thức môi trường thích hợp nhất cho sự tạo rễ cây Râu mèo là môi trường MS cơ bản + agar 9 g/l + sucrose 30 g/l + α -NAA 0,8 mg/l, với số rễ/chồi là 10,80 rễ, chiều dài trung bình của rễ là 5,21 cm sau 8 tuần nuôi cấy. Giá thể phù hợp để cây *in vitro* ra ngoài môi trường tự nhiên là đất thịt trung bình + cát + trấu hun tỉ lệ 2:1:1.

Từ khóa: giá thể, IBA, NAA, *Orthosiphon aristatus*, tạo rễ.

Ngày nhận bài: 02/6/2019; Ngày hoàn thiện: 21/6/2019; Ngày đăng: 15/7/2019

STUDY ON CREATION OF *IN VITRO* ROOTS AND SUBSTRATES IN THE ARBORETUM OF *Orthosiphon aristatus* PLANTLETS

Thongkham LAPHASY¹, Phạm Thị Thanh Nhân^{*2}

¹Khangkhay College of Education, Xiengkhoang province, Laos

²University of Education - TNU

ABSTRACT

Orthosiphon aristatus is well-known for a popular medical plant with the uses to treat kidney stones, hypoglycemia, acute and chronic nephritis, gout, rheumatism, hepatitis, diabetes mellitus, cancer ... This article presents the results of effects of auxin, substrates on root formation, growth and development of *Orthosiphon aristatus* from Laos in order to contribute to finding a *in vitro* multiplication process to develop this plant in Vietnam. The optimum medium formula for the root formation of *Orthosiphon aristatus* is the basal MS medium supplemented with α -NAA 0.8 mg/l, a number of roots per a shoot are 10,80, the medium length of a root is 5.21cm after 8 culturing weeks. The suitable medium for them to develop at the nursery stage before growing in the mass-production is medium soil: sand: burned husk with the ratio of 2: 1: 1.

Keywords: IBA, NAA, *Orthosiphon aristatus*, root formation, substrate

Received: 02/6/2019; Revised: 21/6/2019; Published: 15/7/2019

* Corresponding author. Email: ptnhanbio@dhsptn.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Cây Râu mèo hay cây Bông bạc (*Orthosiphon aristatus*) là vị thuốc Đông y có tác dụng điều trị bệnh sỏi thận, tăng bài tiết, hạ đường huyết, chữa viêm thận cấp tính và mãn tính, thống phong, thấp khớp, thấp ngoài khớp, viêm gan, đái tháo đường [1], [2]... Trong Râu mèo, các chất kali, orthosiphonin, mesoisonitol tác dụng lợi tiểu, làm tăng bài tiết chất cặn bã như urê, acid uric, Na^+ , Cl^- ... và đặc biệt không làm mất kali nhiều như các thuốc lợi tiểu tây y [3], [4]. Stampoulis và cộng sự đã phát hiện ra chiết xuất methanol của *O. stamineus* có hoạt tính chống lại tế bào ung thư biểu mô, tế bào ung thư gan di căn 26-L5, HT-1080 [3], [5].

Đã có nghiên cứu chứng minh flavonoid và axit phenolic được chiết xuất từ lá cây Râu mèo có liên quan đến hoạt động chống oxy hóa của cơ thể [3]. Tác dụng chống viêm và giảm đau của dịch chiết xuất lá *O. stamineus* đã được nghiên cứu trên động vật thí nghiệm [6]. Kết quả cho thấy có sự hiện diện của các hợp chất polyphenolics, glycosides, flavon lipophilic, dẫn xuất axit caffeic, triterpenes và diterpens [7], [8]. Adam và cộng sự [9] cho rằng *O. stamineus* có tác dụng giảm đau và không gây nghiện.

Ở Việt Nam, Râu mèo phân bố rải rác ở vùng đồng bằng và miền núi như: Cao Bằng, Vĩnh Lộc, Ba Vì, Lâm Đồng, Tuy Hòa, Phan Rang, Phú Quốc... Tuy nhiên, số lượng cây không đáp ứng đủ nhu cầu sử dụng. Theo Viện Dược liệu, hàng năm Việt Nam phải nhập khẩu hàng chục tấn cây Râu mèo từ Trung Quốc, Campuchia, Lào... [10], [11]. Giá thị trường hiện nay khoảng 150000 đồng/Kg tươi. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu tạo rễ *in vitro* và ra cây Râu mèo trên giá thể nhằm hoàn thiện quy trình nhân nhanh loài cây này ở Việt Nam.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và hóa chất nghiên cứu

Mẫu cây Râu mèo được thu thập tại tỉnh Xiêng Khoảng, Lào và được trồng tại Vườn

Thực nghiệm Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên.

Các hóa chất như cồn, javen, axit benzoic, axit citric, thành phần môi trường MS0, sucrose, agar, than hoạt tính, các hóa chất điều hòa sinh trưởng BAP, kinetin có nguồn gốc từ Việt Nam, Trung Quốc, Merk.

Các thiết bị chính dùng trong nghiên cứu gồm có: Nồi hấp khử trùng Tomy (Nhật Bản), tủ sấy (Đức), tủ lạnh (Nhật Bản), tủ cấy vô trùng esco (Singapore), cân điện tử (Đức)...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tạo rễ và cây hoàn chỉnh: Môi trường được sử dụng: MS + đường sucrose 30 g/l + agar 9 g/l + than hoạt tính 1 g/l và bổ sung thêm chất kích thích sinh trưởng (α -NAA, IBA) với các nồng độ khác nhau (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 mg/l), pH 5,8. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện nhiệt độ 25-27°C, thời gian chiếu sáng 12/24h, cường độ chiếu sáng 2000 lux. Phương pháp: Cắt chồi ngọn của cây Râu mèo khoảng 2-3 cm, cắt bớt lá, cấy vào môi trường đã chuẩn bị sẵn. Mỗi công thức cấy 30 chồi. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sau đó theo dõi sự phát triển của cây sau 4, 6 và 8 tuần.

Phương pháp đưa cây *in vitro* ra vườn ươm: Trước khi đem cây *in vitro* ra trồng ngoài vườn ươm, bình cây được đặt trong điều kiện nhiệt độ phòng, bỏ nắp giấy và nút bông. Sau 24 giờ, cây được lấy ra khỏi bình và được rửa sạch môi trường *in vitro*, đem trồng trong các bầu giá thể. Các bầu này được đặt nơi ánh sáng khuếch tán, thoáng mát, tưới đủ ẩm mỗi ngày. Mỗi loại giá thể trồng 30 cây.

Phương pháp xử lý kết quả: Các số liệu thống kê được xử lý bằng phần mềm Excel theo Chu Văn Mẫn (với $P < 0,05$ và $\alpha = 0,05$) [12].

Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - ĐHTN Thái Nguyên.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của auxin đến sự hình thành rễ cây Râu mèo

3.1.1. Ảnh hưởng của α -NAA đến sự hình thành rễ cây Rau mero

Ra rễ là khâu cuối cùng của giai đoạn nghiên cứu *in vitro*. Chất kích thích sinh trưởng được dùng chủ yếu ở giai đoạn này thuộc nhóm auxin. IBA và α -NAA là những chất kích thích chủ yếu tác động lên quá trình phân chia tế bào và sự hình thành rễ. α -NAA là chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin, có tác dụng làm tăng hô hấp của tế bào và mô nuôi cấy, tăng hoạt tính enzyme và ảnh hưởng

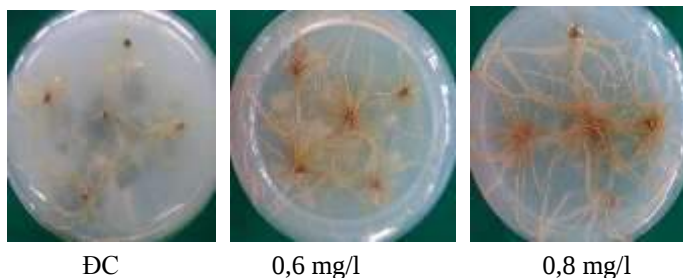
mạnh đến trao đổi nito, tăng khả năng tiếp nhận và sử dụng đường trong môi trường nuôi cấy. α -NAA có tác dụng tạo rễ mạnh hơn các auxin khác.

Các chồi khi đạt được chiều cao 2,0 - 4,0 cm được cấy chuyển sang môi trường MS cơ bản có bổ sung agar 9 g/l + sucrose 30 g/l + α -NAA với các nồng độ khác nhau. Đối chứng là môi trường MS cơ bản có bổ sung agar 9 g/l + sucrose 30 g/l. Qua nghiên cứu chúng tôi thu được kết quả trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của α -NAA đến sự hình thành rễ cây Rau mero

Công thức	Nồng độ NAA (mg/l)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Hình thái rễ	Chất lượng rễ
Sau 4 tuần					
ĐC	0	2,07±1,23	1,95±0,85	Mảnh, yếu	+
CT1	0,2	7,43±1,07	1,48±0,79	mập, khô	++
CT2	0,4	7,37±1,19	1,58±0,73	mập, khô	++
CT3	0,6	7,83±1,46	1,64±0,76	mập, khô	+++
CT4	0,8	8,77±1,52	1,72±0,75	mập, khô	+++
CT5	1	7,90±1,58	1,66±0,74	mập, khô	++
Sau 6 tuần					
ĐC	0	2,30±1,14	3,14±1,08	Mảnh, yếu	+
CT1	0,2	8,60±1,16	3,05±1,18	mập, khô	++
CT2	0,4	9,00±0,64	3,09±1,16	mập, khô	++
CT3	0,6	9,57±1,22	3,19±1,15	mập, khô	+++
CT4	0,8	10,53±1,17	3,30±1,15	mập, khô	+++
CT5	1	9,87±1,07	3,18±1,16	mập, khô	++
Sau 8 tuần					
ĐC	0	2,33±1,52	5,03±1,37	Mảnh, yếu	+
CT1	0,2	8,77±1,17	4,96±1,31	mập, khô	++
CT2	0,4	9,20±0,55	5,00±1,29	mập, khô	++
CT3	0,6	9,83±0,99	5,08±1,30	mập, khô	+++
CT4	0,8	10,80±1,03	5,21±1,29	mập, khô	+++
CT5	1	10,03±0,96	5,10±1,30	mập, khô	++

(Ghi chú: chất lượng rễ tốt: +++; chất lượng rễ trung bình: ++; chất lượng rễ kém: +)



Hình 1. Ảnh hưởng của NAA đến sự tạo rễ của cây Rau mero sau 8 tuần nuôi cấy

Qua bảng 1 cho thấy nồng độ α -NAA ảnh hưởng đến sự hình thành và phát triển rễ của cây Rau mero trong nuôi cấy *in vitro*. Số chồi hình thành rễ, số rễ/chồi cũng như chiều dài rễ tăng dần khi nồng độ α -NAA tăng từ 0,4- 0,8 mg/l, khi nồng độ α -NAA tiếp tục tăng thì số chồi hình thành rễ và số rễ/chồi giảm dần. Môi trường có bổ sung α -NAA 0,8 mg/l cho hiệu quả cao nhất. Sau 4 tuần nuôi cấy, số rễ/chồi đạt 8,77, chiều dài rễ là 1,72 cm. Sau 6 tuần nuôi cấy, số rễ/chồi đạt 10,53,

chiều dài rễ là 3,30 cm. Sau 8 tuần nuôi cấy, số rễ/chồi đạt 10,80, chiều dài rễ là 5,21 cm.

Như vậy, môi trường bổ sung nồng độ NAA tối ưu cho sự hình thành và phát triển rễ của cây Râu mèo là môi trường MS cơ bản + agar 9 g/l + sucrose 30 g/l + α -NAA 0,8 mg/l, với số rễ/chồi là 10,80 rễ, chiều dài trung bình của rễ là 5,21cm.

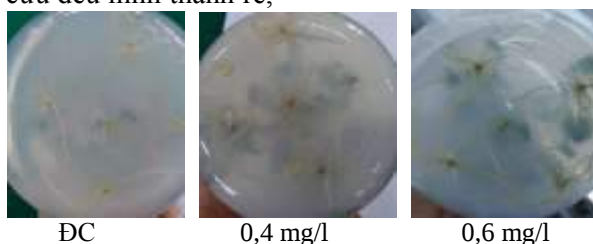
3.1.2. Ảnh hưởng của IBA đến sự hình thành rễ cây Râu mèo

Cũng như thí nghiệm trên, thí nghiệm nghiên cứu sự ảnh hưởng của IBA đến khả năng hình thành rễ được tiến hành với các nồng độ khác nhau, kết quả thu được sau nuôi cấy 4, 6 và 8 tuần được thể hiện trong bảng 2, hình 2.

Từ kết quả trình bày ở bảng 2 cho thấy, tất cả các môi trường nghiên cứu đều hình thành rễ,

tuy nhiên khả năng hình thành rễ của chồi cây Râu mèo khác nhau ở các môi trường khác nhau. Các môi trường có chất kích thích sinh trưởng IBA đều cho tỷ lệ chồi ra rễ cao hơn nhiều so với môi trường đối chứng (môi trường không có chất kích thích sinh trưởng IBA). Môi trường có bổ sung IBA 0,6 mg/l cho hiệu quả tạo rễ cao nhất. Sau 4 tuần nuôi cấy, số rễ/chồi đạt 6,63, chiều dài rễ là 2,57 cm. Sau 6 tuần nuôi cấy, số rễ/chồi đạt 7,20, chiều dài rễ là 4,26 cm. Sau 8 tuần nuôi cấy, số rễ/chồi đạt 7,33, chiều dài rễ là 6,16 cm.

Như vậy, môi trường tối ưu cho sự hình thành và phát triển rễ của cây Râu mèo là môi trường MS cơ bản bổ sung agar 9 g/l + sucrose 30 g/l + IBA 0,6 mg/l, với số rễ/chồi là 7,33 rễ, chiều dài trung bình của rễ là 6,16 cm.



Hình 2. Ảnh hưởng của IBA đến sự tạo rễ của cây Râu mèo sau 8 tuần nuôi cấy

Bảng 2. Ảnh hưởng của IBA đến sự hình thành rễ cây Râu mèo

Công thức	Nồng độ IBA (mg/l)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Hình thái rễ	Chất lượng rễ
Sau 4 tuần					
ĐC	0	2,07±1,23	1,95±0,85	mảnh, yếu	+
CT1	0,2	5,17±1,34	2,50±1,07	mảnh, yếu	++
CT2	0,4	5,93±1,60	2,65±1,06	mảnh, yếu	++
CT3	0,6	6,63±1,30	2,57±1,10	mảnh, khỏe	+++
CT4	0,8	5,83±1,34	2,58±1,07	mảnh, khỏe	+++
CT5	1,0	5,63±1,27	2,56±1,08	mảnh, yếu	++
Sau 6 tuần					
ĐC	0	2,30±1,14	3,14±1,08	mảnh, yếu	+
CT1	0,2	5,87±1,36	4,11±1,50	mảnh, yếu	++
CT2	0,4	6,77±1,19	4,24±1,50	mảnh, yếu	++
CT3	0,6	7,20±1,13	4,26±1,45	mảnh, khỏe	+++
CT4	0,8	6,90±0,96	4,15±1,54	mảnh, khỏe	+++
CT5	1,0	6,70±1,02	4,04±1,54	mảnh, yếu	++
Sau 8 tuần					
ĐC	0	2,33±1,52	5,03±1,37	mảnh, yếu	+
CT1	0,2	6,00±1,53	5,99±1,64	mảnh, yếu	++
CT2	0,4	6,90±1,30	6,13±1,64	mảnh, yếu	++
CT3	0,6	7,33±1,18	6,16±1,60	mảnh, khỏe	+++
CT4	0,8	7,07±0,98	6,04±1,68	mảnh, khỏe	+++
CT5	1,0	6,83±0,99	5,97±1,67	mảnh, yếu	++

(Ghi chú: chất lượng rễ tốt: +++; chất lượng rễ trung bình: ++; chất lượng rễ kém: +)

Khi so sánh môi trường nuôi cấy có bổ sung NAA 0,8 mg/l với môi trường nuôi cấy có bổ sung IBA 0,6 mg/l. Chúng tôi nhận thấy, sau 8 tuần nuôi cấy, tỉ lệ mẫu tạo rễ, số rễ/mẫu ở môi trường bổ sung NAA 0,8 mg/l cao hơn so với môi trường nuôi cấy bổ sung IBA 0,6 mg/l. Điều đó cho thấy, với ảnh hưởng riêng rẽ của NAA và IBA thì NAA 0,8 mg/l kích thích sự phát sinh rễ từ mẫu nuôi cấy của cây Râu mèo là đạt hiệu quả cao hơn so với IBA.

3.2. Ảnh hưởng của giá thể đến sự sinh trưởng, phát triển của cây Râu mèo ngoài nhà lưới

Lựa chọn giá thể thích hợp để đưa cây ra ngoài vườn ươm cũng là một khâu quan trọng trong quá trình nhân giống vô tính. Cây *in vitro* được nuôi trong điều kiện ổn định về nguồn dinh dưỡng, ánh sáng, nhiệt độ... Vì thế, trước khi đem cây ra trồng ngoài vườn ươm, ta đưa cây ra khỏi phòng cây đặt trong điều kiện nhiệt độ phòng bình thường, bỏ nắp giấy và nút bông, để khoảng 24h. Sau đó lấy

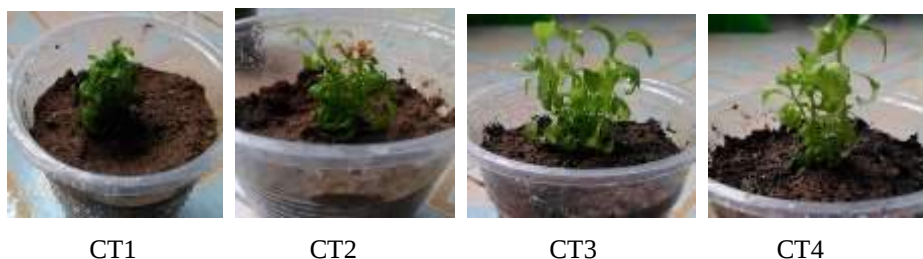
cây ra khỏi bình, đem trồng trong các giá thể nghiên cứu. Trong thời gian cây con thích nghi với điều kiện môi trường (tối thiểu là khoảng 2-3 tuần), cây con cần được chăm sóc và bảo vệ cẩn thận. Các bầu này được cho vào các khay, đặt nơi ánh sáng khuếch tán, thoáng mát, tưới đủ ẩm mỗi ngày để cây con dần thích nghi với điều kiện bên ngoài. Kết quả thu được ở bảng 3 và hình 3.

Qua bảng 3 cho thấy, giá thể CT1 có tỉ lệ cây sống là 60,00 %, và chiều cao là 3,83cm, lá cây màu xanh nhạt, có nhiều lá bị rụng, cây không phát triển thêm lá mới. Giá thể CT2 có tỉ lệ cây sống là 50,00% và chiều cao là 3,80 cm. Giá thể CT3 có tỉ lệ cây sống là 60,00 %, và chiều cao là 3,83 cm, lá màu xanh đậm, cây xuất hiện lá mới. Giá thể CT4 có tỉ lệ cây sống là 70,00 %, và chiều cao là 3,86 cm, lá màu xanh đậm cây phát sinh thêm lá mới. Như vậy, giá thể phù hợp để cây *in vitro* ra ngoài môi trường tự nhiên là đất thịt trung bình + cát + trấu hun tỉ lệ 2:1:1.

Bảng 3. Ảnh hưởng của giá thể đến cây trồng trong bầu sau 6 tuần

Công thức	Thành phần giá thể	Tỉ lệ cây sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Chất lượng cây
CT1	Đất thịt trung bình	60,00 ± 0,52	3,83 ± 0,98	+
CT2	Đất thịt trung bình + cát (2:1)	50,00 ± 0,53	3,80 ± 0,84	++
CT3	Đất thịt trung bình + trấu hun (2:1)	60,00 ± 0,52	3,83 ± 0,98	+++
CT4	Đất thịt trung bình + trấu hun + cát (2:1:1)	70,00 ± 0,53	3,86 ± 0,90	+++

Ghi chú: (+): Lá cây chuyển màu xanh nhạt, có nhiều lá bị rụng, không phát triển thêm lá mới; (++) : Lá màu xanh đậm, chưa xuất hiện lá mới; (+++): Lá màu xanh đậm, phát sinh thêm lá mới.



Hình 3. Cây Râu mèo *in vitro* trên các giá thể sau 6 tuần

4. Kết luận

Công thức môi trường thích hợp nhất cho sự tạo rễ cây Râu mèo là môi trường MS cơ bản + agar 9 g/l + sucrose 30 g/l + α - NAA 0,8 mg/l, với số rễ/chồi là 10,80 rễ, chiều dài trung bình của rễ là 5,21cm sau 8 tuần nuôi cấy.

Giá thể phù hợp để cây *in vitro* ra ngoài môi trường tự nhiên là đất thịt trung bình + cát + trấu hun tỉ lệ 2:1:1.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn sự hỗ trợ của Đề tài cấp Đại học mã số ĐH2018-TN04-02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. C. Maheswari, R. Maryammal, R. Venkatanarayanan, "Hepatoprotective activity of *Orthosiphon stamineus* on liver damage caused by paracetamol in rats", *Jordan J. Biol. Sci.*, 1, pp.105–108, 2008.
- [2]. M. F. Yam, R. Basir, M. Z. Asmawi, Z. Ismail, "Antioxidant and hepatoprotective effects of *Orthosiphon stamineus* Benth. standardized extract", *Am. J. Chin. Med.*, 35, pp.115–126, 2007.
- [3]. S. Awale, Y. Tezuha, A. H. Banskota, K. Kouda, M. T. Kyaw, S. Kadota, "Five novel highly oxygenated diterpenes of *Orthosiphon stamineus* from Myanmar", *J. Nat. Prod.*, 64, pp. 592–596. doi: 10.1021/np000607t, 2001.
- [4]. N. D. Yuliana, A. Khatib, A. M. Link-Struensee, A. P. Ijzerman, F. Rungkat-Zakaria, Y. H. Choi, R. Verpoorte, "Adenosine A1 receptor binding activity of methoxy flavonoids from *Orthosiphon stamineus*", *Planta Med.*, 75, pp.132–136, 2009.
- [5]. S. Awale, Y. Tezuka, A. H. Banskota, K. Kouda, K. M. Tun, S. Kadota, "Four highly oxygenated isopimarane-type diterpenes of *Orthosiphon stamineus*", *Planta Med.*, 68, pp. 286–288, 2002.
- [6]. C. H. Ho, I. Noryati, S. F. Sulaiman, A. Rosma, "In vitro antibacterial and antioxidant activities of *Orthosiphon stamineus* Benth. extracts against food-borne bacteria", *Food Chem.*, 122, pp.1168–1172, 2010.
- [7]. H. B. Sahib, A. F. Aisha, M. F. Yam, M. Z. Asmawi, Z. Ismail, S. M. Salhimi, N. H. Othman, A. M. S. Abdul Majid, "Anti-angiogenic and antioxidant properties of *Orthosiphon stamineus* Benth. methanolic leaves extract", *Int. J. Pharmacol.*, 5, pp. 162–167. doi: 10.3923/ijp.2009.162.167, 2009.
- [8]. M. F. Yam, M. Z. Asmawi, B. Rusliza, "An investigation of the anti-inflammatory and analgesic effects of *Orthosiphon stamineus* leaf extract", *J. Med. Food*, 2, pp. 362–368. doi: 10.1089/jmf.2006.065, 2008.
- [9]. Y. Adam, M. N. Somchit, M. R. Sulaiman, A. A. Nasaruddin, A. Zuraini, A. A. Bustamam, Z. A. Zakaria, "Diuretic properties of *Orthosiphon stamineus* Benth", *J. Ethnopharmacol.*, 124, pp. 154–158, 2009.
- [10]. <http://vienduoclieu.org.vn/tin-chi-tiet/-/chi-tiet/su-can-thiet-phat-trien-duoc-lieu-354-677.html>
- [11]. <http://suckhoedoisong.vn/cay-rau-meo-thong-tieu-tru-soi-than-n87848.html>
- [12]. Chu Văn Mẫn (2000), *Ứng dụng tin học trong sinh học*, Nxb Đại học quốc gia Hà Nội.