Archive of SID

تولید و نگهداری کشت سلولی گیاه
Digitalis nervosa Steud & Hochst و بررسی متابولیت‌های ثانویه آن

نصراله قاسمي دهكردي(Ph.D.)* غلامرضا اصغري(Ph.D.) ** فريده وشاحي(Ph.D.)***

چكيده

سابقه و هدف: گیاه Digitalis nervosa از گیاهان جنس دیژیتال ، تنها گونهٔ بومی ایران از جنس Digitalis بوده و مهم‌ترین گلیکوزید قلبی آن لاناتوزید A می باشد. در این تحقیق، تولید و نگهداری کشت سلولی گیاه و بررسی تولید متابولیت‌های ثانویه آن انجام شده است.

مواد و روشها : دانه های گیاه توسط الکل اتیلیک ۷۰درصد و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد استریل شد و دانه رست‌های استریل به‌دست آمده در شرایط آسپتیک به محیط کشت Murshige and Skoog (MS) با غلظت‌های مختلف تنظیم کننده های رشد، منتقل و تولید کالوس در سه منطقهٔ جوانهٔ انتهایی ، هیپوکوتیل و ریشه چه بررسی شد. آزمون‌های مقدماتی شیمیایی و جداسازی و شناسایی گلیکوزیدهای قلبی به روش کروماتوگرافی لایهٔ نازک در گیاه و کالوس انجام شد.

یافته ها : استفاده از هیپوکلریت سدیم ۵ درصد نسبت به الکل اتیلیک ۷۰ درصد، اثر مهاری کم‌تری روی قوهٔ نامیه بذر داشت. بهترین محیط کشت برای تولید و نگهداری کالوس دارای تنظیم کننده رشد 2,4-Dichloro phenoxy acetic acid(0.5 mg/L) ، Kinetin 0.5mg/L) و Naphthalene acetic acid NAA(1 mg/L) بوده است. بیش‌ترین درصد تولید کالوس، مربوط به منطقهٔ ریشه چه دانه رست‌ها بود. نتایج آزمایش‌های مقدماتی تشخیص ساپونین ها ، تانن ها فلاونوئیدها، استروئیدها و گلیکوزیدهای قلبی در گیاه و کالوس، مثبت مشاهده شد. در بررسی TLC ترکیبات گلیکوزیدی قلبی با Rf های متفاوت در کالوس‌های مختلف، مشاهده شد.

استنتاج : یکی از عوامل اصلی در تولید کالوس، نسبت تنظیم کننده های رشد اوکسین به سیتوکینین می باشد و این نسبت برای مناسب‌ترین محیط کشت، ۳ به ۱ بود. به نظر می رسد کشت کالوس گیاه *D. nervosa* توانایی تولید گلیکوزیدهای قلبی را دارا می باشد.

واژه هاي كليدي : کشت سلولی، Digitalis nervosa ، متابولیت‌های ثانویه، گلیکوزیدهای قلبی

مقدمه

سیستم های کشت سلول گیاهی، منبع بالقوه ای از داروهای با ارزش، مواد طعم دهنده و معطر، اسانس ها و رنگ دهنده هایی را که به وسیلهٔ سنتز شیمیایی و یا سلول‌های میکروبی قابل تولید نمی‌باشند، فراهم می‌کند. پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی مولکولی، آنزیم شناسی، فیزیولوژی و فن‌آوری فرمانتاسیون در کشت سلول گیاهی نشان می دهد که این سیستم ها یک منبع حیاتی برای فراورده های طبیعی مهم، خواهند بود(۱). از جمله گیاهان دارویی مهم، گیاهان جنس دیژیتال

* متخصص فارماکوگنوزی- دانشیار دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ✉ اصفهان : دانشگاه علوم پزشکی اصفهان- دانشکده داروسازی
** متخصص فارماکوگنوزی دانشیار دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی *** دانشجویی دکترای داروسازی- دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
تاریخ دریافت: ۸۲/۷/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۲/۹/۸ تاریخ تصویب : ۸۳/۲/۲

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

Archive of SID

(Digitalis) می باشد که منبع بسیار مهم ترکیبات دارویی چون دیگوکسین و دیژیتوکسین می باشند.

گونهٔ Digitalis nervosa Steud & Hochst تنها گونهٔ بومی این جنس در ایران ، پراکندگی وسیعی در شمال کشور دارد و تولید تعدادی از گلیکوزیدهای قلبی شامل لاناتوزید A، لاناتوزید B و لاناتوزید E ، گلوکوژیتوروزید و آلفا استیل دیژیتوکسین در آن گزارش شده است(۲). گلیکوریدهای قلبی در انواع نارسایی احتقانی قلب ، فیبریلاسیون دهلیزی ،فلوتر دهلیزی ، تاکیکاردی حمله ای دهلیزی و شوک قلبی کاربرد درمانی دارند(۳).

مطالعات کشت سلول و بافت گیاهی برای تولید گلیکوریدهای قلبی ، اولین بار توسط Hildebrandt و Riker در سال ۱۹۵۹ ارائه شد. در سال ۱۹۶۲ ، Staba در مورد نیازمندی‌های غذایی کشت بافت Digitalis purpurea, Digitalis lanata تحقیقاتی انجام داد. گرچه تعدادی از مقالات، تولید گلیکوزیدهای قلبی درکشت بافت Digitalis را توضیح داده اند، عموماً تولید نهایی (Yield) خیلی پایین بوده است. علاوه بر آن در خلال واکشت، میزان کاردنولیدها غالبا" کاهش یافته و ناپدید می شوند. اما بسیاری از پژوهش ها نشان دادند که تمایز مورفولوژیکی باعث افزایش تولید می شود(۴). در مطالعه ای که بر روی کشت نوساقهٔ D.lanata توسط Reinhard و همکارانش(۱۹۹۳) انجام شده، بسته به نوع دودمان تا ده کاردنولید مختلف شناسایی شد(۵). همچنین Kartnig و همکاران(۱۹۷۶) در طی مطالعه ای توانستند در کشت برگ D. ppurea پانزده کاردنولید را استخراج و بعضی از آن‌ها را شناسایی نمایند(۶).

کشت دانه‌رست‌ها یا قطعات جدای کشت گیاهان بر روی محیط های حاوی آگار که منجر به تولید توده‌های سلولی آمورف می‌شود را کشت کالوس می‌نامند. کلید اصلی برای نگهداری کالوس، انتخاب ترکیبات مناسب محیط‌کشت و قطعات جدا شده مناسب و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی می‌باشد و این مهم هنوز در سطح وسیعی به طور تجربی حاصل می‌شود(۸،۷).

با توجه به بررسی‌های انجام شده، کشت سلولی گیاه Digitalis nervosa تاکنون گزارش نشده است. با توجه به جایگاه درمانی بسیار مهم گلیکوزیدهای قلبی در پزشکی و همچنین وسعت مطالعات انجام شده در زمینهٔ کشت سلول و بافت گیاه دیژیتال به منظور دستیابی به این ترکیبات ،در این تحقیق ، تولید و نگهداری کشت سلولی گیاه Digitalis nervosa و بررسی تولید متابولیت‌های ثانویه آ ن مدنظر قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

گیاه در خردادماه ۱۳۸۰ از منطقهٔ سوردار (ارتفاع از سطح دریا (۱۴۰۰ تا ۲۰۰۰ متر) واقع در شمال ایران جمع آوری شد و هویت آن توسط زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان مورد تایید قرار گرفت . نمونه های گیاهی که با شماره هرباریوم D25 ثبت شده، پس از جمع آوری خشک گردید و مقداری از برگ خشک شده گیاه توسط آسیاب برقی پودر شد و جهت انجام آزمایش آماده گردید. دانه های گیاه در تاریخ مهرماه ۱۳۸۰ در همان منطقه جمع آوری شد تا از آن در تهیه دانه رست استفاده شود.

تولید و نگهداری کالوس :

دانه های دیژیتال را از درون کپسول‌هایی که از ناحیهٔ فوقانی، کمی شکافته بودند، جدا نموده و تعدادی از آن‌ها تحت شرایط آسپتیک در زیر کابین لامینارفلو توسط الکل اتیلیک ۷۰درصد به مدت ۲/۵ دقیقه و

تعداد دیگر توسط هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

Archive of SID

۳ دقیقه استریل شدند. پتری دیش های حاوی دانه های استریل در اتاق کشت در تاریکی و دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس میزان تاثیر استریل کننده‌ها بر ناباروری و همچنین قوهٔ نامیهٔ بذر بررسی گردید.

برای تولید و نگهداری کالوس از دانه رست‌های استریل به‌دست آمده، محیط کشت MS جامد با ترکیبی از اکسین و سیتوکینین به عنوان تنظیم کننده های رشد گیاهی به کار رفت. جدول شمارهٔ-۱، مشخصات کلیه محیط کشت‌های به کار رفته را نشان می دهد.

جدول شماره ۱ : مشخصات محیط کشت‌های به‌کار رفته برای تولید کالوس گیاه Digitalis nervosa

شماره محیط کشت	تنظیم کننده های رشد مختلف با غلظت های متفاوت محیط + کشتMS
۱	2,4-D (0.75 mg/L) + Kin (0.075 mg/L)
۲	2,4-D (1 mg/L) + Kin (0.1 mg/L) + Coconut Milk (150 ml/L)
۳	2,4-D (1 mg/L) + Kin (0.1 mg/L) + Active charcoal (0.5%)
۴	2,4-D (0.5 mg/L) + Kin (0.5 mg/L) + NAA (1 mg/L) + Coconut Milk (150 ml/L)
۵	2,4-D (1 mg/L) + Kin (0.1 mg/L) + Vit C (5mg/L)
۶	Without any Phytohormone
۷	2,4-D (0.5 mg/L) + Kin (0.5 mg/L) + NAA (1 mg/L) + Vit C (5mg/L)
۸	2,4-D (1 mg/L) + Kin (0.2 mg/L) + Vit C (5mg/L)
۹	2,4-D (2 mg/L) + Kin (0.2 mg/L)
۱۰	2,4-D (1 mg/L) + Kin (0.1 mg/L)
۱۱	2,4-D (1 mg/L) + Kin (0.2 mg/L)

پس از پدیدار شدن و رشد دانه رست‌ها از دانه های استریل ،با استفاده از کابین لامینارفلو آن‌ها را به درون ارلن مایرهای حاوی‌کشت‌های MS منتقل نموده و سپس نیمی از محیط کشت‌ها تحت تیمار تاریکی مطلق و نیمی دیگر در روشنایی مطلق در شرایط دمایی ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت مدت زمان کافی ،تولید کالوس در سه منطقهٔ مریستمی در طول دانه رست مورد بررسی قرار گرفت. این سه منطقه عبارت بودند از: الف- (جوانهٔ انتهایی و برگچه)، ب- (هیپو کوتیل) و ج: (ریشه چه).

پس از آن‌که کالوس روی بافت اولیه تشکیل شد و برای مدت زمانی رشد کرد، لازم است آن‌را به یک محیط کشت تازه انتقال دهند. کالوس‌های حاصل از هر منطقهٔ مریستمی دانه رست، به‌طور جداگانه تحت شرایط آسپتیک به یک محیط کشت تازه واکشت شدند. مطالعه برروی کالوس تا ۹ نسل ادامه داشت.

آزمایشات مقدماتی جهت شناسایی و مقایسهٔ مواد متشکلهٔ گیاه و کالوس:

نمونه های مورد بررسی برای آزمایشات مقدماتی عبارتند از : پودر برگ خشک شدهٔ گیاه و نمونه پودر کالوس خشک نسل های مختلف حاصل از منطقهٔ (ریشه چه‌ی) دانه رست در محیط ۴ و ۷ (تاریکی مطلق و روشنایی- تاریکی).

آزمون‌های مایر و واگنر برای شناسایی آلکالوئیدها، آزمایش بورن تراگر برای بررسی و شناسایی آنتراکینون‌ها، آزمایش های ویلسون تابوک و ردوکس برای شناسایی فلاونوئیدها، آزمایش ایجاد کف جهت بررسی وجود ساپونین ها، ایجاد رسوب با محلول استات سرب برای شناسایی تانن‌ها همچنین آزمون لیبرمن بورچاد و سالکوسکی به ترتیب برای شناسایی استروئیدها و تری ترپنوئیدها انجام گردید (۹،۲)

پس از انجام مراحل جداسازی گلیکوزیدهای قلبی در نمونه گیاه و کالوس ،واکنش های کد(۵و۱۵) و بالجت(۲و۱۰) و لیبرمن بورچاد(۲و۱۰) بر روی حاصل جداسازی انجام گردید.

برای انجام کروماتوگرافی لایهٔ نازک، بر روی حاصل جداسازی، سیلیکاژل GF_{254} به عنوان فاز ثابت و

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

Archive of SID

سیستم حلال: اتیل استات- متانل- آب (۸ – ۱۱ –۸۱) به عنوان فاز متحرک انتخاب گردید. نمونه مورد استفاده، حاصل جداسازی گلیکوزیدهای قلبی در گیاه یا کالوس که درحلال دی‌کلرومتان- اتانل(۱ :۱) حل شده می‌باشد (۱۰). پس از کاشت نمونه و گسترش حلال بر روی لایهٔ نازک جهت آشکارسازی از مصرف کد و معرف کلرامین T برای اسپری روی پلیت کروماتوگرام استفاده گردید (۲، ۹و۱۱).

یافته ها

بررسی اثر استریل کننده ها در استریل شدن و قوهٔ نامیهٔ دانه ها:

کلیهٔ پتری دیش های حاوی دانه‌ها تحت تاثیر الکل اتیلیک ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد بدون آلودگی مشاهده شدند. پس از گذشت دو هفته از زمان استریل شدن، بررسی‌ها نشان داد که ۱۶/۲۵ درصد از دانه های استریل شده توسط الکل اتیلیک ۷۰ درصد، دانه رست تولید نموده و این میزان برای دانه های تحت تاثیر هیپوکلریت سدیم ۵ درصد برابر ۵۱/۵ درصد بود. نتایج حاصله در جدول شماره ۲ آورده شده است. نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری بین استفاده از الکل اتیلیک و هیپوکلریت سدیم وجود دارد و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد اثر مهاری کم‌تری بر روی قوهٔ نامیهٔ بذر دارد. ($P <$ ۰/۰۱). تعداد پتری دیش‌ها برای هر آزمایش ۶ عدد می‌باشد.

جدول شمارهٔ ۲ : نتایج تأثیر الکل اتیلیک ۷۰ درصد (۲/۵ دقیقه) و تأثیر هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (۳ دقیقه) بر روی قوهٔ نامیهٔ دانه‌های دیژیتال

شمارهٔ پلیت	۱	۲	۳	۴	۵	۶	میانگین
درصد تولید دانه رست (الکل اتیلیک)	۳۰/۷۶	۰	۲۸/۵۷	۱۸/۱۸	۲۰	۰	۱۶/۲۵
درصد تولید دانه است (هیپوکلریت سدیم)	۵۰	۴۲/۸۰	۴۴/۴	۷۵	۵۸/۳۰	۳۷/۵۰	۵۱/۵۰

نتایج مربوط به تولید کالوس در مناطق مختلف دانه رست در جدول۳ ارائه شده است. دانه رست‌های مختلف در محیط کشت‌های مورد بررسی از نظر تولید کالوس، نتایج متفاوتی نشان دادند. نتایج به‌دست آمده در جدول۴ نمایش داده شده است.

جدول شمارهٔ ۳ : درصد تولید کالوس از مناطق مختلف دانه رست ها در کل محیط کشت‌ها

منطقهٔ دانه رست	الف : جوانه انتهایی و برگچه	ب : هیپوکوتیل (محور زیر لپه ای)	ج : ریشه چه
درصد تولید کالوس	۳۵/۷۱	۵۰	۷۸/۵۷

درصد آب موجود در کالوس:

محیط کشت ۴ (تیمار روشنایی ۱۲ ساعت – تاریکی ۱۲ ساعت): میانگین درصد آب موجود در کالوس نسل های هفتم ، هشتم ،نهم به ترتیب برابر ۹۳/۶۴، ۹۳/۶۹، ۹۲/۹۳ اندازه گیری شد. محیط کشت ۷ (تیمار تاریکی مطلق) : میانگین درصد آب موجود در کالوس نسل هفتم ،هشتم و نهم به ترتیب ۹۴/۵۲، ۹۳/.۳ و ۹۲/۷۶ به‌دست آمد.

آزمایشات فیتوشیمیایی:

نتایج آزمایشات مقدماتی در نمونه کالوس و گیاه نشان داد که آزمون‌های تشخیصی آلکالوئیدها و آنتراکینون‌ها و همچنین آزمون رودکس در تشخیص گروهی از فلاونوئیدها منفی بوده و آزمون‌های تشخیصی ساپونین‌ها،فلاونوئیدها، تانن‌ها، گلیکوزیدهای قلبی، استروئیدها و تری ترپنوئیدها مثبت می‌باشد. نتایج واکنش کد و واکنش بالجت برای کالوس‌های محیط شمارهٔ ۴ (تیمار تاریکی مطلق و تیمار تاریکی–

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

www.SID.ir

Archive of SID

روشنایی) و محیط شمارهٔ ۷ (تیمار تاریکی مطلق) مثبت مشاهده گردید.

جدول شمارهٔ ۴ : مشخصات کالوس حاصله از دانه رست‌ها در محیط کشت‌های مختلف مورد بررسی

نوع محیط کشت	تیمار اولیه	رنگ	ترد	سفت	منطقهٔ تولید کنندهٔ کالوس در طول دانه رست	مدت دوام **
۱	روشنایی مطلق	سبز روشن	+	-	الف، ب، ج	نسل دوم
۲	تاریکی مطلق	سبزکمی تیره	+	-	الف، ب	نسل دوم
۴	تاریکی مطلق	کرمی تیره	+	-	ج	نسل چهاردهم
	روشنایی مطلق	سبز روشن	+	-	الف، ب، ج	نسل چهاردهم
۵	روشنایی مطلق	سبز کمرنگ	+	-	الف، ج	نسل سوم
	تاریکی مطلق	سبز تیره	+	-	الف، ج	نسل دوم
۶	روشنایی مطلق	سبزمایل به زرد	+	-	الف، ب، ج	نسل سوم
۷	تاریکی مطلق	سبز کرمی	+	-	ج	نسل چهاردهم
	روشنایی مطلق	سبز روشن	+	-	ج	نسل پنجم
۸	روشنایی مطلق	سبز روشن	+	-	ج	نسل اول
۹	روشنایی مطلق	سبز روشن	+	-	ج	نسل اول
۱۰	روشنایی مطلق	سبزکمی روشن	+	-	الف، ب، ج	نسل سوم
	تاریکی مطلق	سبز کمی تیره	+	-	الف، ب، ج	نسل اول
۱۱	تاریکی مطلق	سبز تیره	+	-	ج	نسل اول

الف: جوانه انتهایی و برگچه ب: هیپوکوتیل(محور زیر لپه‌ای) ج: ریشه چه

* در محیط کشت شماره ۳ هیچ یک از ۶ نمونه مورد بررسی کالوس تولید نکردند.

** منظور از مدت دوام، تعداد دوره‌های واکشتی که در طی آن‌ها کالوس زنده مانده و نگهداری شده است(کالوس‌های حاصله از تیمار تاریکی مطلق، در طول واکشت‌های خود در این نوع تیمار نگهداری شدند ولی همه کالوس‌های حاصله از تیمار روشنایی مطلق پس از واکشت اول در وضعیت ۱۲ ساعت تاریکی- ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند).

در واکنش کـد، قسمت لاکتـون موجـود در گلیکوزیدهای قلبی درمحیط قلیایی با مشتقات نیتروبنزن واکنش داده و رنگ ارغوانی ایجاد شد. در واکنش بالجت، تری نیتروفنل (اسید پیکریک) در محیط قلیایی با حلقهٔ لاکتون گلیکوزیدهای قلبی واکنش داده و رنگ نارنجی ایجاد شد. با ایجاد رنگ سبز مایل به آبی در نتیجهٔ آزمایش لیبرمن بورچاد در بررسی نمونه گیاه و کالوس‌های محیط۴و۷، وجود حلقهٔ استروئیدی مشخص گردید (۲، ۱۰ و ۱۳).

در بررسی عصاره کالوس برای شناسایی و تفکیک گلیکوزیدهای قلبی به روش TLC، در کالوس محیط کشت ۴ (تیمار روشنایی- تاریکی) از نسل های ششم تا نهم در مجمـوع چهـار فراکسیـون با Rf مختلف (۸۲، ۵۸، ۵۶و۲۰) تحت آشکارسازی با معرف کد مشخص گردید. در بررسی عصاره کالوس نسل هفتم تحت آشکارسازی با معرف کلرامین T و مشاهده در طول موج ۳۶۵ نانومتر سه فراکسیون با Rf برابر ۸۲، ۵۶ و ۱۴ و یک منطقه با محدودهٔ Rf (۹۱-۸۹) مشاهده گردید. در بررسی کروماتوگرام عصارهٔ کالوس‌های نسل هفتم و هشتم مربوط به محیط کشت ۴ (تیمار تاریکی مطلق) دو فراکسیون با Rf= ۵۸ و Rf = ۲۰ پس از آشکارسازی با معرف کد به‌دست آمد که در بررسی کروماتوگرام دیگری پس از آشکارسازی با معرف کلرامین T و مشاهده در طول موج ۳۶۵ نانومتر سه فراکسیون با Rf های ۲۰ ، ۵۸ و ۹۰ قابل مشاهده بودند و در بررسی کالوس‌های نسل هفتم و هشتم مربوط به محیط کشت ۷ (تیمار تاریکی مطلق)، دو فراکسیون با Rf =۵۸ و Rf = ۷۲ پس از آشکارسازی با معرف کد نشان داده که هر دو فراکسیون در کروماتوگرام دیگر

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

Archive of SID

پس از آشکارسازی با معرف کلرامین T نیز قابل مشاهده بودند.

در بررسی عصارهٔ برگ گیاه پس از آشکارسازی با معرف کلرامین T چندین فراکسیون با Rf مختلف (۸۹، ۸۲، ۷۲، ۵۷، ۴۵، ۴۲، ۳۷) مشاهده شد و در بررسی با معرف کد فراکسیون‌های با Rf های ۳۷، ۴۲و ۴۵ مشاهده شدند. با مقایسهٔ این اعداد و Rf مواد استاندارد مشخص گردید که لاناتوزید A، B ، E در گیاه وجود دارند ولی دیگوکسین و دیژیتوکسین وجود ندارند. همچنین در کالوس، هیچ‌کدام از این ترکیبات مشاهده نشدند.

بحث

در بررسی تأثیر الکل اتیلیک ۷۰درصد و هیپو کلریت سدیم ۵درصد بر روی قوهٔ نامیهٔ بذر مشخص گردید که با توجه به نتایج آزمون t-student ($P\theta.01$) هیپوکلریت سدیم ۵ درصد اثر مهاری کم‌تری روی قوهٔ نامیهٔ بذر داشته و نسبت به الکل اتیلیک ۷۰ درصد ارجح می باشد. بیش‌ترین درصد تولید کالوس در محیط کشت‌های مختلف مربوط به منطقهٔ ریشه چه دانه رست‌ها بوده و بنابراین میتوان گفت بخش های مختلف دانه رست، توانایی و قابلیت های متفاوت برای تشکیل کالوس دارند. اکثر قریب به اتفاق کالوس‌های تولید شده پس از واکشت‌های اولیه به سرعت سیاه و نکروز شدند.افزودن موادی چون زغال فعال و یا ویتامین C (به عنوان آنتی اکسیدان) تأثیر مثبتی در رفع قهوه ای شدن بافت کالوس نداشت. در بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده های رشد در تولید و نگهداری کالوس ، مشخص گردید که در محیط کشت شمارهٔ ۴ و ۷ با ترکیب یکسان تنظیم کننده های رشد نمونه کالوس‌هایی به‌دست آمد که ترد ،سبز رنگ و خوش رشد بوده و طی واکشت‌های بعدی به رشد خود ادامه دادند. بهترین محیط کشت دارای تنظیم کننده های رشد شامل 2,4-D(0.5mg/l) و K(0.5mg/l) و NAA(1mg/l) بوده که در آن نسبت آکسین به سیتوکینین برابر ۱ : ۳ بود که پایین‌ترین نسبت موجود درکل محیط کشت‌های مورد بررسی می باشد.

در بررسی نتایج آزمایشات فیتو شیمیایی اولیه مشخص گردید که نتایج حاصله برای نمونه گیاه و کالوس‌های حاصله از منطقهٔ ریشه چه دانه رست‌ها مشابه بود. آزمون‌های تشخیص آنتراکینون ها و آلکالوئیدها منفی مشاهده شد. وجود آنتراکینون ها و جداسازی آن‌ها به روش کروماتوگرافی از جنین های سوماتیکی تشکیل شده در کشت سلولی گیاه Digitalis lanata در سال ۱۹۸۶ گزارش شده بود(۱۴). آزمایش ایجاد کف در شناسایی ساپونین ها در نمونه گیاه و کالوس، مثبت مشاهده شد. قبل از این، شناسایی دو ساپونین در بیست و چهار سری کالوس گیاه Digitalis purpurea توسط Gurny درسال ۱۹۸۱ گزارش شده بود(۱۵). و در بررسی نتایج آزمون لیبرمن بورچاد و سالکوسکی وجود ترکیبات‌استروئیدی و تری‌ترپنوئیدها در گیاه و کالوس، مثبت تلقی گردید. شناسایی چهار استرول در بیست و چهار سری کالوس D.purpurea و تشخیص وجود پروژسترون در ۲۱ سری از این کالوس‌ها طی مطالعه ای توسط Gurny (۱۹۸۱) مشخص گردیده است (۱۵). در مقایسهٔ نمونه کالوس‌ها و گیاه در کروماتوگرام‌های حاصله و مشاهدهٔ دیژیتوکسین به عنوان شاهد به نظر می‌رسد که درنمونه کالوس‌های محیط۴ و ۷، لانوتوزید E,B,A و دیگوکسین و دیژیتوکسین وجود ندارد ولی ترکیبات کاردنولیدی دیگر با Rf مختلف (۷۲، ۸۲، ۵۶،۵۸،۲۰) وجود دارند که با معرف کلرامین T آشکارسازی می شوند.

Kartnig و همکاران (۱۹۷۹) گزارش کردند در کشت کالوس حاصل از ریشه های گیاهان D.purpurea,D. lanata که سه ماهه بودند با به کار بردن روش‌های TLC ، ستون کروماتوگرافی و HPLC مشخص گردید که در

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

Archive of SID

مـورد D.purpurea کاردنولیـدها در تیمـار تـاریکی و روشنایی ایجاد شد و ۸-۷ گروه کاردنولیـد را تشـخیص دادند که فقـط لانادوکسـین در هـر دو محیط مشـترک بـود(۱۶). تولیـد کاردنولیـدها در کشـت سـلولی گیـاه Digitalis nervosa کم‌تر از گیاه مادر می‌باشد، ولی بـه کارگیری عواملی مانند نـور مـی‌توانـد موجـب افـزایش تولید شود. بررسی سایر عوامل محرک تولید، دسترسـی به کاردنولیدهای بیش‌تری را ممکن می‌سازد.

فـهـرست مـنـابـع

1. Dicosmo F, Misawa M. Plant cell and tissue culture, Alternatives of metabolite production. ***Bio. Tech. Advances***. 1995; 13(3): 425-433.

۲. آزادبخت م. بررسی مورفولوژی و فیتوشیمیایی مواد مؤثرهٔ گیاه *Digitalis nervosa* Steud & Hochst ***پایان نامه دکترای (Ph.D) فارماکوگنوزی . دانشکده داروسازی*** ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. ۱۳۷۴ ص: ۸، ۲۰-۱۸ و ۵-۱۷۴و۱۷۸، ۱۳۷۴.

3. Drug Facts and Comparisons. Hebel S.K., CADA O.J. New York: ***Facts and Comparisons***. 2001: 179-83

4. Misawa M. Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites: ***Delhi; Daya Publishing House;*** 1997; 18, 32-3, 47-50.

5. Reinhard E, Kreis W, Stuhlenmey U. Cardiac glycosides in partly subemerged shoots of *Digitalis lanata*. ***Planta Med.*** 1993; 59(6): 539-45.

6. Kartnig T, Russheim U, Maunz B. Study of the formation of cardenolides in the tissue cultures of *D. purpurea* and *D. lanata*. ***Planta Med***. 1976: 29(May): 275-82.

7. Dixon R.A and Gonzales R.A. ***Plant cell culture, A practical Approach***. New York; Oxford University Press. 1994: 1,6,7,10-15.

۸. افشاری پور ، س. ***مبانی کشت بافت گیاهی***. اصفهان : انتشارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی۱۳۷۲، ص: ۳۰ ، ۱۰۵-۹۶ و ۱۳۷۲.

۹. اشتال، م. ***تجزیه و شناسایی مواد دارویی گیاهی به روش میکروسکوپی وکروماتوگرافی***. ترجمه: صمصام شریعت، اصفهان: مؤسسه انتشارات مشعل. ۱۳۶۸ : ص ۵۳-۱۴۳. ۱۳۶۸.

10. Wagner H, Bladt S, Zgainsk EM. ***Plant drug Analysis a thin layer chromatography atlas***. Translated by Scott T. A., Springer-Verlag, 1984, 195-224.

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

Archive of SID

derivatives in somatic embryos of ***Digitalis lanata***. ***Pharmazie***; 1986: 41(Jul): 521-2.

15. Gurny PL, Tabacchi R, Baud C. and Cullus culture of *Digitalis purpurea* L. part 2: Study of metabolites derived from strols. ***Pharm. Acta.*** Helv (1981); 56 (Jan); 49-54.
16. Kartnig Th, Rubheim U, Trousil G and Cardenolide in callus kulturen von *Digitalis purpurea* and *Digitalis lanata*; callus cultures derived from roots: ***Planta Med***. 1979: 35: 275-8.

۱۱. سجادی جزی، ا . ***مبانی و روش‌های کروماتوگرافی لایهٔ نازک***. اصفهان:انتشارات دانشگاه‌علوم‌پزشکی اصفهان ۱۳۸۱ ص : ۸۴-۸۲ و ۱۰۴-۹۹.

۱۲. قاسمی دهکردی، ن و طالب . ا.م. ***استخراج و شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات موجود درگیاهان دارویی شاخص***. اصفهان : چوگان ۱۳۸۰. ص ۱۱۱-۱۰۷.

۱۳. قاسمی، ن و معطر، ف. ***دستور کار آزمایشگاه فارماکوگنوزی*** . اصفهان:. دانشکدهٔ داروسازی و علوم دارویی. ۱۳۷۱ ص : ۸-۷ ، ۱۸-۱۳ ، ۲۳ و ۲۸ و ۴-۳۲ و ۳۹،۱۳۷۱.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

www.SID.ir