

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

نصراله قاسمی دهکردی (Ph.D.) * غلامرضا اصغری (Ph.D.) ** فریده وشاحی (Ph.D.) ***

چکیده

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

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

یافته‌ها: استفاده از هیپوکلریت سدیم ۵ درصد نسبت به الکل اتیلیک ۷۰ درصد، اثر مهاری کم‌تری روی قوه نامیه بذر داشت. بهترین محیط کشت برای تولید و نگهداری کالوس دارای تنظیم کننده رشد Naphthalene acetic acid NAA (1 mg/L) و 2,4-Dichloro phenoxy acetic acid (0.5 mg/L)، Kinetic 0.5 mg/L بوده است. بیش‌ترین درصد تولید کالوس، مربوط به منطقه ریشه چه دانه رست‌ها بود. نتایج آزمایش‌های مقدماتی تشخیص ساپونین‌ها، تانن‌ها 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 کننده‌های رشد اوکسین به سیتوکینین می‌باشد و این نسبت برای مناسب‌ترین محیط کشت، ۳ به ۱ بود. به نظر می‌رسد کشت کالوس گیاه *D. nervosa* توانایی تولید گلیکوزیدهای قلبی را دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کشت سلولی، *Digitalis nervosa*، متابولیت‌های ثانویه، گلیکوزیدهای قلبی

مقدمه

سلول‌های میکروبی قابل تولید نمی‌باشند، فراهم می‌کند. پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی مولکولی، آنزیم‌شناسی، فیزیولوژی و فن‌آوری فرمانتاسیون در کشت

سیستم‌های کشت سلول گیاهی، منبع بالقوه‌ای از داروهای با ارزش، مواد طعم‌دهنده و معطر، اسانس‌ها و رنگ‌دهنده‌هایی را که به وسیله سنتز شیمیایی و یا

✉ اصفهان: دانشگاه علوم پزشکی اصفهان - دانشکده داروسازی
*** دانشجوی دکتری داروسازی - دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

* منحصص فارماکوگنوزی - دانشیار دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
** منحصص فارماکوگنوزی دانشیار دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی

☞ تاریخ دریافت: ۸۲/۷/۱۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۲/۹/۸ تاریخ تصویب: ۸۲/۲/۲

جمله گیاهان دارویی مهم، گیاهان جنس دیژیتال

سلول گیاهی نشان می‌دهد که این سیستم‌ها یک منبع حیاتی برای فراورده‌های طبیعی مهم، خواهند بود (۱). از

اصلی برای نگهداری کالوس، انتخاب ترکیبات مناسب محیط کشت 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 زمینه 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 آن مدنظر قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

گیاه در خردادماه ۱۳۸۰ از منطقه 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 ناحیه فوقانی، کمی شکافته بودند، جدا نموده و تعدادی از آنها تحت شرایط آسپتیک در زیر کابین لامینارفلو توسط الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت ۲/۵ دقیقه و تعداد دیگر توسط هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت

(*Digitalis*) می‌باشد که منبع بسیار مهم ترکیبات دارویی چون دیگوسکین و دیژیتوکسین می‌باشند.

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

مطالعات کشت سلول و بافت گیاهی برای تولید گلیکوزیدهای 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 در کشت بافت *Digitalis* را توضیح داده اند، عموماً تولید نهایی (Yield) خیلی پایین بوده است. علاوه بر آن در خلال واکشت، میزان کاردنولیدها غالباً کاهش یافته و ناپدید می‌شوند. اما بسیاری از پژوهش‌ها نشان دادند که تمایز مورفولوژیکی باعث افزایش تولید می‌شود (۴). در مطالعه ای که بر روی کشت نوساقه *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. purpurea* پانزده کاردنولید را استخراج و بعضی از آنها را شناسایی نمایند (۶).

کشت دانه‌رست‌ها یا قطعات جدای کشت گیاهان بر روی محیط‌های حاوی آگار که منجر به تولید توده‌های سلولی آمورف می‌شود را کشت کالوس می‌نامند. کلید

زمان کافی، تولید کالوس در سه منطقه مریستمی در طول دانه رست مورد بررسی قرار گرفت. این سه منطقه عبارت بودند از: الف- (جوانه انتهایی و برگچه)، ب- (هیپو کوتیل) و ج: (ریشه چه).

پس از آن که 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 منطقه مریستمی دانه رست، به‌طور جداگانه تحت شرایط آسپتیک به یک محیط کشت تازه واگشت شدند. مطالعه بر روی کالوس تا ۹ نسل ادامه داشت.

آزمایشات مقدماتی جهت شناسایی و مقایسه مواد

مشکله گیاه و کالوس:

نمونه‌های مورد بررسی برای آزمایشات مقدماتی عبارتند از: پودر برگ خشک شده گیاه و نمونه پودر کالوس خشک نسل‌های مختلف حاصل از منطقه (ریشه چه) 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، آزمایش‌های ویلسون تابوک و ردوکس برای شناسایی فلاونوئیدها، آزمایش ایجاد کف جهت بررسی وجود ساپونین‌ها، 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، واکنش‌های کد (۱۵و۵) و بالجت (۱۰و۲) و لیبرمن بورچاد (۱۰و۲) بر روی حاصل جداسازی انجام گردید.

برای انجام کروماتوگرافی لایه نازک، بر روی حاصل جداسازی، سیلیکاژل GF₂₅₄ به عنوان فاز ثابت و

۳ دقیقه استریل شدند. پتری دیش‌های حاوی دانه‌های استریل در اتاق کشت در تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس میزان تاثیر استریل‌کننده‌ها بر ناباروری و همچنین قوه نامیه بذر بررسی گردید.

برای تولید و نگهداری کالوس از دانه رست‌های استریل به دست آمده، محیط کشت MS جامد با ترکیبی از اکسین و سیتوکینین به عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به کار رفت. جدول شماره ۱-، مشخصات کلیه محیط‌کشت‌های به کار رفته را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۱: مشخصات محیط کشت‌های به کار رفته برای تولید

کالوس گیاه *Digitalis nervosa*

شماره	تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف با غلظت‌های متفاوت
محیط کشت	محیط + کشت MS
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 دانه‌های استریل، با استفاده از کابین لامینارفلو آن‌ها را به درون ارلن مایرهای حاوی کشت‌های MS منتقل نموده و سپس نیمی از محیط کشت‌ها تحت تیمار تاریکی مطلق و نیمی دیگر در روشنایی مطلق در شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت مدت

نتایج مربوط به تولید کالوس در مناطق مختلف دانه رست در جدول ۳ ارائه شده است. دانه رست‌های مختلف در محیط کشت‌های مورد بررسی از نظر تولید کالوس، نتایج متفاوتی نشان دادند. نتایج به‌دست آمده در جدول ۴ نمایش داده شده است.

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

منطقه دانه رست	الف: جوانه انتهایی و برگچه	ب: هیپوکوتیل (محور زیر لبه 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 شماره ۴ (تیمار تاریکی مطلق و تیمار تاریکی -

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 در حلال دی کلرومتان- اتانل (۱: ۱) حل شده می‌باشد (۱۰). پس از کاشت نمونه و گسترش حلال بر روی لایه نازک جهت آشکارسازی از مصرف کد و معرف کلرامین T برای اسپری روی پلیت کروماتوگرام استفاده گردید (۲، ۹، ۱۱).

یافته‌ها

بررسی اثر استریل کننده ها در استریل شدن و قوه

نامیه دانه ها:

کلیه 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 کم تری بر روی قوه نامیه بذر دارد. ($P < 0/01$). تعداد پتری دیش‌ها برای هر آزمایش ۶ عدد می‌باشد.

جدول شماره ۲: نتایج تأثیر الکل اتیلیک ۷۰ درصد (۲/۵ دقیقه) و تأثیر هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (۳ دقیقه) بر روی قوه نامیه دانه‌های دیزیتال

شماره پلٹ	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

روشنایی) و محیط شماره ۷ (تیمار تاریکی مطلق) مثبت مشاهده گردید.
جدول شماره ۴: مشخصات کالوس حاصله از دانه رست‌ها در محیط کشت‌های مختلف مورد بررسی

نوع محیط کشت	تیمار اولیه	رنگ	ترد	سفت	منطقه تولیدکننده کالوس در طول دانه رست	مدت دوام **
۱	روشنایی مطلق	سبز روشن	+	-	الف، ب، ج	نسل دوم
۲	تاریکی مطلق	سبز کمی تیره	+	-	الف، ب	نسل دوم
۴	تاریکی مطلق	کریمی 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	سبز مایل به زرد	+	-	الف، ب، ج	نسل سوم
۷	تاریکی مطلق	سبز کریمی	+	-	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	سبز کمی 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 واکنشی که در طی آن‌ها کالوس زنده مانده و نگهداری شده است (کالوس‌های حاصله از تیمار تاریکی مطلق، در طول واکنش‌های خود در این نوع تیمار نگهداری شدند ولی همه کالوس‌های حاصله از تیمار روشنایی مطلق پس از واکنش اول در وضعیت ۱۲ ساعت تاریکی-۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند).

تحت آشکارسازی با معرف کلرامین T و مشاهده در طول موج ۳۶۵ نانومتر سه فراکسیون با R_f برابر ۸۲، ۵۶ و ۱۴ و یک منطقه با محدوده R_f (۹۱-۸۹) مشاهده گردید. در بررسی کروماتوگرام عصاره کالوس‌های نسل هفتم و هشتم مربوط به محیط کشت ۴ (تیمار تاریکی مطلق) دو فراکسیون با $R_f = ۵۸$ و $R_f = ۲۰$ پس از آشکارسازی با معرف کد به دست آمد که در بررسی کروماتوگرام دیگری پس از آشکارسازی با معرف کلرامین T و مشاهده در طول موج ۳۶۵ نانومتر سه فراکسیون با R_f های ۵۸، ۲۰ و ۹۰ قابل مشاهده بودند و در بررسی کالوس‌های نسل هفتم و هشتم مربوط به محیط کشت ۷ (تیمار تاریکی مطلق)، دو فراکسیون با $R_f = ۷۲$ و $R_f = ۵۸$ پس از آشکارسازی با معرف کد نشان داده که هر دو فراکسیون در کروماتوگرام دیگر

در واکنش کد، قسمت لاکتون موجود در گلیکوزیدهای قلبی در محیط قلبی با مشتقات نیتروبنزن واکنش داده و رنگ ارغوانی ایجاد شد. در واکنش بالجت، تری نیتروفل (اسید پیکریک) در محیط قلبی با حلقه لاکتون گلیکوزیدهای قلبی واکنش داده و رنگ نارنجی ایجاد شد. با ایجاد رنگ سبز مایل به آبی در نتیجه آزمایش لیبرمن بورچاد در بررسی نمونه گیاه کالوس‌های محیط ۷، وجود حلقه 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 نسل‌های ششم تا نهم در مجموع چهار فراکسیون با R_f مختلف (۸۲، ۵۸، ۲۰ و ۵۶) تحت آشکارسازی با معرف کد مشخص گردید. در بررسی عصاره کالوس نسل هفتم

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 بوده که پایین ترین نسبت موجود در کل محیط کشت های مورد بررسی می باشد.

در بررسی نتایج آزمایشات فیتو شیمیایی اولیه مشخص گردید که نتایج حاصله برای نمونه گیاه و کالوس های حاصله از منطقه ریشه چه دانه رست ها مشابه بود. آزمون های 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 در سال ۱۹۸۱ گزارش شده بود (۱۵). و در بررسی نتایج آزمون لیبرمن بورچاد و سالکوسکی وجود ترکیبات استروئیدی و تری ترینوئیدها 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 کالوس ها طی مطالعه ای توسط Gurny (۱۹۸۱) مشخص گردیده است (۱۵). در مقایسه نمونه کالوس ها و گیاه در کروماتوگرام های حاصله و مشاهده دیژیتوکسین به عنوان شاهد به نظر می رسد که در نمونه کالوس های محیط ۴ 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 آشکار سازی 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 روش های TLC، ستون کروماتوگرافی و HPLC مشخص گردید که در

پس از آشکار سازی با معرف کلرامین T نیز قابل مشاهده بودند.

در بررسی عصاره برگ گیاه پس از آشکار سازی با معرف کلرامین T چندین فراکسیون با Rf مختلف (۸۹، ۸۲، ۷۲، ۵۷، ۴۵، ۴۲، ۳۷) مشاهده شد و در بررسی با معرف کد فراکسیون های با Rf های ۳۷، ۴۲ و ۴۵ مشاهده شدند. با مقایسه این اعداد و Rf مواد استاندارد مشخص گردید که لانوتوزید A، B، E در گیاه وجود دارند ولی دیگوکسین و دیژیتوکسین وجود ندارند. همچنین در کالوس، هیچ کدام از این ترکیبات مشاهده نشدند.

بحث

در بررسی تأثیر الکل اتیلیک ۷۰ درصد و هیپو کلریت سدیم ۵ درصد بر روی قوه نامیه بذر مشخص گردید که با توجه به نتایج آزمون t-student (P<0.01) هیپوکلریت سدیم ۵ درصد اثر مهاری کمتری روی قوه نامیه بذر داشته و نسبت به الکل اتیلیک ۷۰ درصد ارجح می باشد. بیشترین درصد تولید کالوس در محیط کشت های مختلف مربوط به منطقه ریشه چه دانه رست ها بوده و بنابراین میتوان گفت بخش های مختلف دانه رست، توانایی و قابلیت های متفاوت برای تشکیل کالوس دارند. اکثر قریب به اتفاق کالوس های تولید شده پس از واکنش های 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 غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد در تولید و نگهداری کالوس، مشخص گردید که در محیط کشت شماره ۴ و ۷ با ترکیب یکسان تنظیم کننده های رشد نمونه کالوس هایی به دست آمد که ترد، سبز رنگ و خوش رشد بوده و طی واکنش های بعدی به رشد خود ادامه دادند. بهترین محیط کشت دارای تنظیم کننده های رشد

Digitalis nervosa کم تر از گیاه مادر می باشد، ولی به کارگیری عواملی مانند نور می تواند موجب افزایش تولید شود. بررسی سایر عوامل محرک تولید، دسترسی به کاردنولیدهای بیش تری را ممکن می سازد.

مورد *D. purpurea* کاردنولیدها در تیمار تاریکی و روشنایی ایجاد شد و ۷-۸ گروه کاردنولید را تشخیص دادند که فقط لانادوکسین در هر دو محیط مشترک بود (۱۶). تولید کاردنولیدها در کشت سلولی گیاه

فهرست منابع

1. Dicosmo F, Misawa M. Plant cell and tissue culture, Alternatives of metabolite production. *Bio. Tech. Advances*. 1995; 13(3): 425-433.
2. آزادبخت م. بررسی مورفولوژی و فیتوشیمیایی مواد مؤثره گیاه *Digitalis nervosa* Steud & Hochst پایان نامه دکترای (Ph.D) فارماکوگنوزی. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. ۱۳۷۴ ص: ۸، ۲۰-۱۸ و ۵-۱۷۴ و ۱۷۸، 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 submerged 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.
8. افشاری پور، س. مبانی کشت بافت گیاهی. اصفهان: انتشارات معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ۱۳۷۲، ص: ۳۰، ۱۰۵-۹۶ و ۱۳۷۲.
9. اشتال، م. تجزیه و شناسایی مواد دارویی گیاهی به روش میکروسکوپی و کروماتوگرافی. ترجمه: صمصام شریعت، اصفهان: مؤسسه انتشارات مشعل. ۱۳۶۸: ص ۵۳-۱۴۳. ۱۳۶۸.
10. Wagner H, Blatt S, Zgainsk EM. *Plant drug Analysis a thin layer chromatography atlas*. Translated by Scott T. A., Springer-Verlag, 1984, 195-224.

۱۱. سجادی جزی، ا. مبانی و روش‌های کروماتوگرافی لایه نازک. اصفهان: انتشارات دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ۱۳۸۱ ص: ۸۴-۸۲ و ۱۰۴-۹۹.
۱۲. قاسمی دهکردی، ن و طالب . م. استخراج و شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات موجود در گیاهان دارویی شاخص. اصفهان: چوگان ۱۳۸۰. ص ۱۱۱-۱۰۷.
۱۳. قاسمی، ن و معطر، ف. دستور کار آزمایشگاه فارماکوتکنوزی . اصفهان: دانشکده داروسازی و علوم دارویی. ۱۳۷۱ ص: ۸-۷، ۱۳-۱۸، ۲۳ و ۲۸-۴ و ۳۲-۳۹، ۱۳۷۱.
14. Hering F, Nagy M, Tomko J. and Digitolutein and other anthraquinone 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.