دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

مطالعه کشت بافت گیاه گل انگشتانه (*Digitalis nervosa* staud & Hochst)

مرضیه کریمی[۱]، سید کمال کاظمی تبار[۲]، محمد آزاد بخت[۳] و قربانعلی نعمت زاده[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: mr.karimi83@gmail.com)
۲ و ۴- دانشیار و استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استاد دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۲۴

چکیده

در این تحقیق تکنیک‌های مختلف کشت بافت در گیاه *Digitalis nervosa* مورد مطالعه قرار گرفت. گیاهان این جنس از گیاهان مهم دارویی می‌باشند که منبع گلیکوزیدهای قلبی مهمی چون دیگوکسین، دیژیتوکسین و انواع لاناتوزیدها می‌باشد به منظور بررسی کالزایی در ریزنمونه‌های برگ، از هورمون‌های مختلف گیاهی و منابع مختلف کربن استفاد گردید. عنوان منابع اکسین از هورمون‌های 2,4-D در سه سطح (۰، ۱، ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و NAA نیز در سه سطح (۰/۵، ۱، ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و هورمون BAP در دو سطح (۰/۵، ۱ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده گردید. بهترین ترکیب محیط کشت از لحاظ زمان کمتر برای القای کالوس محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر 2,4-D بود. چهار منبع مختلف کربن شامل ساکاروز، مالتوز، فروکتوز و گالاکتوز بود. بهترین محیط کشت کالزایی برای ریزنمونه‌های برگ، محیط کشت MS محتوی قند ساکاروز به میزان۳۰ گرم بر لیتر با ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA معرفی گردید. در بین ریزنمونه‌های مختلف برگ، هیپوکوتیل، کوتیلدون و ریشه، بیشترین میزان کالزایی را ریزنمونه کوتیلدون نشان داد. بررسی اندام زایی در کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های برگ با استفاده از هورمون‌های BAP و NAA صورت گرفت. بهترین محیط باززایی محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود. همچنین در بررسی تعیین بهترین محیط کشت برای باززایی از دو محیط MS و B5 استفاده گردید که درصد بیشتر باززایی در محیط کشت MS مشاهده شد. در نهایت به منظور ریشه زایی از محیط کشت MS حاوی ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA (ایندول بوتریک اسید) استفاده گردید، که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین این دو سطح به منظور القای ریشه وجود نداشت.

واژه‌های کلیدی: *Digitalis nervosa* staud & Hochst، کالوس، باززایی، ریشه زایی، گلیکوزیدهای قلبی

مقدمه

از جمله گیاهان دارویی مهم، گیاهان جنس *Digitalis* هستند که متعلق به تیره Scrophulariaceae و منبع بسیار مهم ترکیبات دارویی نظیر دیگوکسین و دیژیتوکسین می‌باشند. گونه *Digitalis nervosa* تنها گونه بومی ایران بوده و پراکندگی وسیعی در شمال ایران دارد. این گیاه دارای گلیکوزیدهای قلبی، ساپونین، تری ترپنوئید، تانن و فلاونوئید می‌باشد و تعدادی از گلیکوزیدهای قلبی شناخته شده در این گیاه شامل لاناتوزید A، لاناتوزید B، لاناتوزید E، گلوکوژیتوروزید، نئوگلوکودیژیفوکوزید، آلفا استیل دیژیتوکسین و آلفا استیل ژیتوکسین می‌باشد (۴). گلیکوزیدهای قلبی در انواع نارسایی‌های احتقانی قلب، فیبریلاسیون دهلیزی، فلوتر دهلیزی، تاکیکاردی حمله ای دهلیزی و شوک قلبی کاربرد درمانی دارند (۱۵،۱۳،۷،۱). بعضی از یافته‌های پژوهشی نشان داده است که شیوع سرطان‌ها در میان بیمارانی که گلیکوزیدهای قلبی دریافت کرده‌اند پایین‌تر بوده و این ترکیبات به علت شباهت ساختمانی آنها با استروژن، تا حدودی اثر حفاظتی در برابر سرطان ایجاد می‌کنند (۹). هاجی مور و همکاران (۱۰) گزارش کردند که چندین فاکتور داخلی و خارجی در تشکیل و رشد کالوس دخالت دارند، فاکتورهای شیمیایی، مواد معدنی و تنظیم کننده‌های رشد به عنوان مهم‌ترین عوامل روی تمایززایی و رشد گیاه مؤثرند. چندین گروه مطالعاتی روی روابط بین تمایز و اندام‌زایی این گیاه با وابستگی آن به ترکیبات و سطوح هورمون‌های گیاهی در محیط کشتی که ریزنمونه رشد می‌کند و همچنین روی تعداد کاردنولیدهای سنتز شده به وسیله چنین ریزنمونه‌های گیاهی داشته اند، گزارش داده‌اند (۶). فاطیما و همکاران (۷) در طی مطالعه‌ای که روی کشت بافت *D. lanata* انجام دادند، گزارش کردند که نمونه‌های برگی این گیاه در مقایسه با سایر ریزنمونه‌های دیگر نظیر ساقه، هیپوکوتیل و ریشه کالوس‌دهی بیشتری داشتند و همچنین به عنوان یک منبع ایده‌ال به منظور باززایی به شمار می‌روند. فوجی و همکاران (۸) در بررسی‌های خود توانستند کالوس‌هایی از اندام‌های مختلف گیاهچه و گیاه بالغ *Digitalis* در کشت شیشه‌ای و مزرعه‌ای بدست آورند. کشت نو ساقه *Digitalis purpurea* توسط هاجیموری و همکاران (۱۱) در تانک تخمیرکننده ۲/۵ لیتری در محیط B5 در حضور هورمون‌های IAA با غلظت ۶ µM و هورمون BA با غلظت ۵ µM انجام شد و بیومس نهایی ۱۵/۴ گرم وزن خشک در هر لیتر بدست آمد (۱۴،۵). قاسمی و همکاران (۱۰) گزارش کردند که بهترین محیط برای تولید و نگهداری کالوس *D. nervosa* محیط دارای تنظیم‌کننده‌های رشد شامل ۲ و ۴- دی کلرو فنوکسی استیک اسید (۱ mgl^{-1})، کینتین (۰/۵ mgl^{-1})، نفتالین استیک اسید (۱ mgl^{-1}) می‌باشد که در آن نسبت اکسین به سیتوکنین برابر ۳:۱ می‌باشد. در این تحقیق پارامترهای مؤثر بر کالوس‌زایی با استفاده از غلظت‌های بیشتری از هورمون‌های NAA، 2,4-D و BAP نسبت به تحقیق قبلی انجام

گرفته و همچنین باززایی این گیاه برای اولین بار مورد بررسی قرار گرفته است و بهترین تیمار هورمونی به منظور القای کالوس، باززایی و ریشه‌دهی تعیین شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی

بذور گیاه *D. nervosa* در مهر ماه سال ۱۳۸۸ از منطقه پارک رویان واقع در شمال ایران جمع آوری شد. بذور در اتاقک استریل به مدت ۵ دقیقه توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ حاوی چند قطره توین ۲۰٪ ضد عفونی شدند. در طی زمان ضدعفونی به آرامی ظرف تکان داده شد تا به خوبی محلول با بذر در تماس باشد. بعد از گذشت این زمان محلول هیپوکلریت سدیم به آهستگی تخلیه شده و برای از بین بردن اثر این محلول ۵ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شد. به منظور تولید گیاهچه استریل، بذور ضدعفونی شده پس از کشت در محیط MS بدون هورمون در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و در دمای ۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

بررسی کالزایی

پس از دستیابی به گیاهچه‌های با بنیه مناسب از ریزنمونه‌های برگی به منظور کالوس‌دهی استفاده گردید. قطعات برگی با ابعاد ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر تهیه و در پتری دیش‌های حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط MS که با gl^{-1} ۳۰ ساکارز، gl^{-1} ۸ آگار و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی تکمیل شده بودند کشت و در دمای ۲± ۲۵ و در شرایط تاریکی نگه‌داری شدند. از هورمون‌های NAA در سه سطح (mgl^{-1} ۰/۵ و ۱) و 2,4-D نیز در سه سطح (mgl^{-1} ۱، ۰ و ۲) به عنوان منابع اکسین و هورمون BAP در دو سطح (mgl^{-1} ۰/۵ و ۱) به عنوان منبع سیتوکنین استفاده گردید که در مجموع ۱۸ تیمار مختلف را تشکیل دادند. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. سی روز پس از کشت درصد کالوس‌دهی، میانگین وزن‌تر کالوس‌ها (از طریق انتقال کالوس‌ها به فویل آلومینیمی که وزن آن صفر شده و بدست آوردن وزن آنها با استفاده از ترازوی حساس) محاسبه شد.

مطالعه بهترین نوع ریزنمونه

برای بررسی اثر ریزنمونه بر میزان کالزایی، از ریزنمونه‌های هیپوکوتیل، برگ، ریشه‌چه و کوتیلدون حاصل از کشت بذور سترون در محیط کشت MS استفاده گردید. به منظور مقایسه، این ریزنمونه‌ها در محیط کشت بهینه کالوس زایی کشت شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد.

مطالعه بهترین منبع کربنی

به این منظور چهار نوع منبع کربن شامل ساکاروز، گلوکز، فروکتوز و مالتوز هر یک با غلظت ۳۰ گرم در لیتر به محیط کشت بهینه‌سازی شده به عنوان تیمارها اضافه گردیدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار طراحی شد.

بررسی میزان باززایی و ریشه‌دهی روش انتخاب بهترین نوع محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد

به منظور بهینه سازی محیط کشت باززایی کالوس‌ها روی محیط کشت پایه B5 و MS که با ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز تکمیل شده بودند کشت گردیدند. در این آزمایش از ۸ نوع ترکیب هورمونی متفاوت که در جدول ۱ نشان داده شده است، استفاده گردید. آگار به میزان ۷ گرم در لیتر به همه محیط‌های کشت اضافه شد. pH همه محیط‌های کشت با NaOH یک نرمال روی عدد ۶ تنظیم شده و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و در فشار $kgcm^{-2}$ ۱/۵ به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. کالوس‌ها پس از کشت در لوله آزمایش یا پتری دیش در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. همچنین به منظور تعیین بهترین محیط کشت باززایی، با استفاده از بهترین ترکیب هورمونی معرفی شده در محیط MS درصد باززایی در دو نوع محیط کشت MS و گامبورگ (B5) مقایسه گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. درصد ساقه‌زایی پس از پنج هفته از رشد گیاهان باززایی شده اندازه‌گیری و جهت تولید ریشه به محیط ریشه‌زایی MS تهیه شده با ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA منتقل شدند.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی مورد استفاده به منظور بررسی باززایی

ترکیبات هورمونی	تیمار
2 mgl^{-1}BAP	T_1
3 mgl^{-1}BAP	T_2
4 mgl^{-1}BAP	T_3
5 mgl^{-1}BAP	T_4
2 mgl^{-1}BAP +0.2 mgl^{-1} NAA	T_5
3 mgl^{-1}BAP +0.3mgl^{-1} NAA	T_6
4 mgl^{-1}BAP +0.4mgl^{-1} NAA	T_7
5 mgl^{-1}BAP +0.5 mgl^{-1} NAA	T_8

نتایج و بحث

ریزنمونه‌ها در حدود یک هفته پس از کشت در محیط کالوس‌دهی، به تدریج متورم شدند. و پس از ۱۷-۹ روز ریزنمونه‌ها شروع به کالوس‌دهی نمودند. بر اساس نتایج مشاهده شده، در تمامی تیمارها به جز تیمارهایی که تنها حاوی بنزیل آمینوپورین در دو سطح ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر بودند، کالوس مشاهده شد و تیمار BAP mgl^{-1} ۱و NAA mgl^{-1} ۱ و 2,4-D mgl^{-1} ۲ به عنوان بهترین تیمار از لحاظ زمان کمتر برای القای کالوس‌دهی دراین محیط بوده است.

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس جدول ۲ نشان داد که اثر متقابل 2,4-D در NAA در BA در سطح احتمال ۱ درصد در تشکیل کالوس معنی‌دار بوده و

بر اساس مقایسه میانگین‌های انجام شده طبق آزمون دانکن بیشترین میزان کالزایی در محیط MS حاوی ۰/۵ mgl^{-1} BAP و mgl^{-1} ۱NAA مشاهده گردید (شکل ۱ و جدول ۳).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر NAA، 2,4-D و BAP بر وزن تر کالوس حاصل از برگ (گرم) بر اساس آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
NAA	۲	۰/۰۰۷	۱۲/۰۸۷**
BAP	۱	۰/۰۰۵	۱/۰۹
2,4-D	۲	۰/۰۴۳	۱۹/۶۲**
اثر متقابل NAA در BAP	۲	۰/۰۲۱	۲/۹۳۴
اثر متقابل 2,4-D در BAP	۴	۰/۰۸۸	۱۹/۲۱۶
اثر متقابل 2,4-D در NAA	۲	۰/۰۰۹	۱/۱۳۵**
اثر متقابل 2,4-D در NAA در BA	۴	۰/۰۱۲	۲/۳۰۱
اشتباه	۵۴	۰/۰۰۱	

ns و**: به ترتیب عدم معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ است.

شکل ۱- نمونه‌ای از کالوس‌های تشکیل شده از ریزنمونه برگی

جدول ۳- مقایسه میانگین وزن تر کالوس حاصل از برگ در سطوح مختلف هورمون‌های 2,4-D، BA و NAA

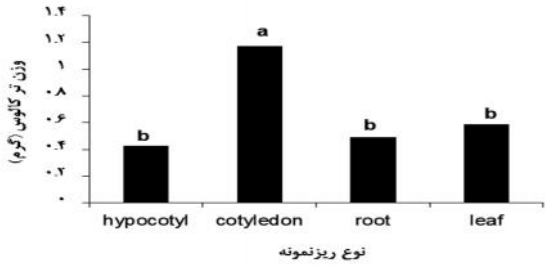
میانگین وزن تر کالوس	تیمار	میانگین وزن تر کالوس	تیمار
۰/۸۲۳ ±۰/۰۰۶^{defg}	$a_2b_2c_1$	۰/۷۰۷^{h}	$a_1b_1c_1$
۰/۸۹۵ ±۰/۰۱۶^{c}	$a_2b_2c_2$	۰/۹۶۹ ±۰/۵۴۳^{b}	$a_1b_1c_2$
۰/۷۸۸ ±۰/۰۱۲^{efg}	$a_2b_2c_3$	۰/۸۸ ±۰/۴۰۳^{cd}	$a_1b_1c_3$
۱/۰۴۱ ±۰/۰۷۸^{a}	$a_3b_1c_1$	۰/۷۰۷^{h}	$a_1b_2c_1$
۰/۸۴۴ ±۰/۰۶۱^{cdef}	$a_3b_1c_2$	۰/۹۹۷ ±۰/۵۸۱^{ab}	$a_1b_2c_2$
۰/۷۶۵ ±۰/۰۰۶^{gh}	$a_3b_1c_3$	۰/۸۵۴ ±۰/۱۶۰^{cde}	$a_1b_2c_3$
۰/۸۲۸ ±۰/۰۰۶^{defg}	$a_3b_2c_1$	۰/۷۸۷ ±۰/۰۰۹^{efg}	$a_2b_1c_1$
۰/۷۸۹±۰/۰۰۵^{efg}	$a_3b_2c_2$	۰/۸۲۵ ±۰/۰۳۵^{defg}	$a_2b_1c_2$
۰/۷۸۳ ±۰/۱۷۲^{fg}	$a_3b_2c_3$	۰/۷۹۸ ±۰/۰۰۱^{efg}	$a_2b_1c_3$

حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست (بر اساس آزمون دانکن).

a_1، a_2، a_3 به ترتیب غلظت‌های مختلف هورمون NAA در سطوح ۰، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر b_1 و b_2 به ترتیب غلظت‌های مختلف هورمون BA در سطوح ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم

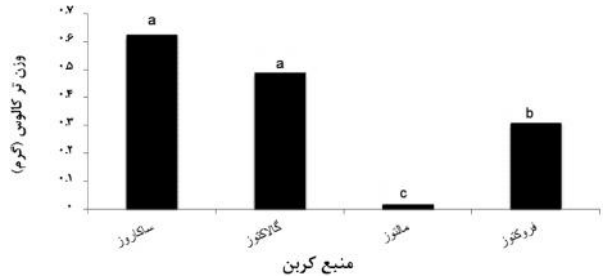
در لیتر، c_1، c_2 و c_3 به ترتیب غلظت‌های مختلف هورمون 2,4-D در سطوح ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر می‌باشند.

نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس نوع ریزنمونه نشان داد که نوع ریزنمونه تأثیر معنی‌داری بر وزن تر کالوس در سطح احتمال ۱ درصد دارد. بیشترین وزن تر کالوس در ریزنمونه کوتیلدون و سپس در برگ مشاهده شد (شکل ۲).



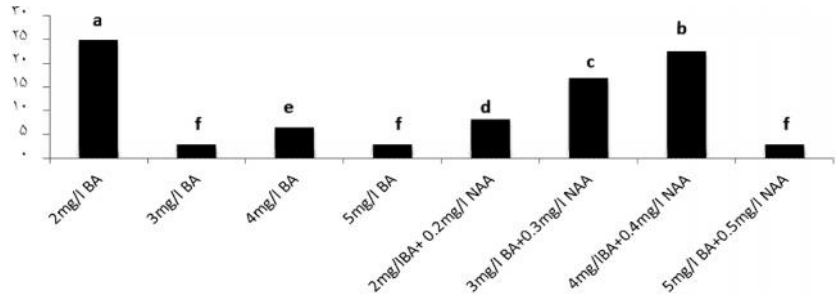
شکل ۲- اثر نوع ریزنمونه بر وزن تر کالوس (گرم)

تجزیه واریانس حاصل از بررسی منبع کربن نشان داد که این منبع اثر معنی‌داری بر میزان کالوس‌زایی در سطح احتمال ۱ درصد داشته و مناسب ترین منبع کربن جهت القای کالوس از ریزنمونه‌های برگی ساکاروز و بعد از آن گالاکتوز می‌باشد و مالتوز کمترین تأثیر را بر میزان کالزایی داشته است (شکل ۳).



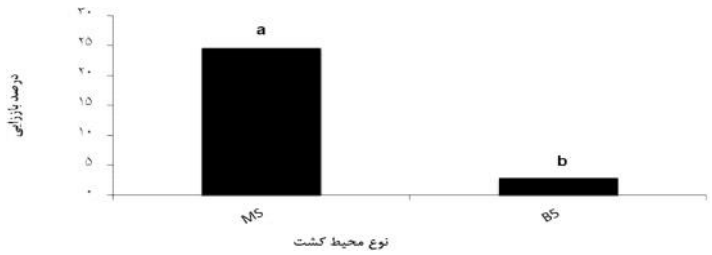
شکل ۳- اثر منابع کربن بر وزن تر کالوس حاصل از برگ (گرم)

نتایج حاصل از تأثیر انواع تنظیم کننده‌های رشد در باززایی گیاه گل انگشتانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تیمارهای هورمونی اثر معنی‌داری را در میزان باززایی داشته‌اند و محیط کشت MS حاوی ۲ mgl^{-1} BA بیشترین درصد باززایی را به خود اختصاص داد و پس از آن بیشترین درصد باززایی مربوط به محیط کشت MS حاوی ۰/۵ mgl^{-1}BAP به همراه ۴ mgl^{-1} NAA بود (شکل ۴).



شکل ۴- تأثیر مقادیر مختلف از هورمون‌های NAA و BA بر درصد باززایی

در بررسی انجام شده، اثر نوع محیط کشت بر درصد باززایی اندام‌های هوایی از کالوس در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود و محیط MS نسبت به محیط B5 (گامبورگ) درصد باززایی بیشتری را به خود اختصاص داد (شکل ۵).



شکل ۵- اثر نوع محیط کشت بر درصد باززایی

شکل ۶- نمونه‌ای از گیاهان باززایی شده

در این آزمایش از هورمون IBA در دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. حدود دو هفته پس از واکشت اندام‌های هوایی باززایی شده در محیط کشت MS حاوی مقادیر متفاوت این هورمون ریشه‌دهی القا شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری در القای ریشه بین دو غلظت به کار برده شده وجود نداشت.

شکل ۷- تشکیل و رشد ریشه در گیاهان باززایی شده

فاکتورهای شیمیایی، مواد معدنی و تنظیم‌کننده‌های رشد به عنوان مهم ترین عوامل روی تمایززایی و رشد گیاه مؤثرند (۱۲). در کشت سلولی، رشد و ریخت‌زایی به طور مشابه به وسیله نوع و غلظت‌های هورمون‌های گیاهی و روابط متقابل بین هورمون‌ها کنترل می‌شود (۱۷). در این تحقیق از هورمون‌های 2,4-D، NAA و BA به منظور القای کالوس استفاده گردید که در همه تیمارهای هورمونی به جز تیمارهایی که فاقد اکسین بودند کالوس القا شد که نشان‌دهنده اهمیت کاربرد اکسین‌ها در القای کالوس در این گیاه می‌باشد در این بررسی اثر متقابل این سه هورمون معنی‌دار بود و بیشترین میزان کالوس‌دهی مربوط به محیط کشت MS حاوی نیم میلی‌گرم در لیتر BA، یک میلی‌گرم در لیتر NAA بوده است که این نتیجه نشان‌دهنده تأثیر بیشتر هورمون NAA نسبت به هورمون 2,4-D در کالزایی گیاه *Digitalis nervosa* می‌باشد. همچنین پالازون و همکاران (۱۶) در مطالعه خود روی گیاه *D. purpurea* گزارش نمودند که جایگزین کردن NAA به عنوان یک اکسین مصنوعی به‌جای IAA باعث افزایش رشد کالوس می‌گردد. در مطالعه‌ای که آسموتو و همکاران (۳) روی کشت بافت گیاه *D. lanata* انجام دادند گزارش کردند که هورمون NAA به تنهایی یا همراه با سیتوکنین‌ها (BA، kin) دارای موفقیت یکسانی برای القای کالوس در ریزنمونه‌های برگی می‌باشد. فاطیما و همکاران (۷) نیز در تحقیق خود روی گیاه *D.lanata* بیان داشتند که NAA باعث القای کالوس می‌گردد ولی همراه با سیتوکنین‌ها القای کالوس توسعه می‌یابد همچنین این محققان محیط کشت MS حاوی NAA $۶mgl^{-1}$ و BA $۳mgl^{-1}$ را به عنوان بهترین محیط به منظور القای کالوس معرفی کردند. نوع ریزنمونه، یکی از عوامل مهمی است که در کالزایی تأثیر بسزایی دارد. در آزمایشی که به منظور مقایسه نوع ریزنمونه در میزان کالزایی صورت گرفت کوتیلدون بیشترین میزان کالوس‌زایی را به خود اختصاص داد این در حالی است که فاطیما و همکاران (۷) گزارش کردند که ریزنمونه‌های برگی برای القای کالوس بهترین پاسخ را نسبت به ریزنمونه‌های دیگر نظیر ساقه، هیپوکوتیل و ریشه داده‌اند و برگ را به عنوان ریزنمونه ایده‌ال برای کشت درون شیشه‌ای در *D.lanata* معرفی نمودند به منظور تعیین مناسب‌ترین منبع کربن اثر قندهای مختلف بر میزان کالوس‌زایی در

ریزنمونه برگی بررسی گردید. از ۴ منبع کربن در این آزمایش استفاده گردید که بهترین پاسخ از لحاظ میزان کالزایی در محیط حاوی ساکاروز و سپس گالاکتوز مشاهده گردید. یکی از دلایلی که ساکاروز معمولاً به عنوان بهترین قند برای کشت بافت گیاهی محسوب می‌شود اینست که این قند باعث تصحیح پتانسیل اسمزی محیط کشت می‌شود که ممکن است به علت جذب کافی و مناسب در طول غشای پلاسمایی باشد (۸). این در حالی است که بهترین منبع کربن در گیاه *D.lanata* به منظور کالزایی مالتوز معرفی شده است (۷).

باززایی گیاه از ریزنمونه کشت شده، مستلزم تولید کالوس‌های پایه و سپس تمایز جوانه ساقه از این بافت است. عوامل مهمی که در کارایی روش باززایی نقش دارند نوع ریزنمونه، محیط کشت پایه و ترکیب هورمون‌ها در کشت بافت می‌باشد (۱۹). سیتوکنین‌ها جز مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد برای باززایی محسوب می‌شوند. در بین آنها BAP مؤثرترین سیتوکنین مورد استفاده در این آزمایش می‌باشد و کینتین و 2ip در درجات بعدی قرار دارند غلظت مواد تنظیم‌کننده رشد در محیط کشت برای اندام‌زایی مهم است. اسکوگ و میلر برای اولین بار نقش مواد تنظیم‌کننده را در اندام‌زایی نشان دادند. در بررسی صورت گرفته روی تعیین بهترین تیمار هورمونی به منظور باززایی از کالوس‌های حاصل از ریزنمونه برگ مشخص گردید که بیشترین میزان اندام‌زایی مربوط به ترکیب هورمونی ۲ میلی‌گرم بر لیتر BA بوده است. در مطالعه صورت گرفته روی گیاه *D.lanata* بهترین محیط کشت به منظور باززایی را محیط کشت MS حاوی ۶ میلی‌گرم بر لیترBAP معرفی نمودند (۷). تحقیقات نیز نشان می‌دهد که یک باززایی موفق در ترکیب اکسین با سیتوکنین بدست می‌آید (۶). BAP به تنهایی کمک به تشکیل جوانه نابجا می‌کند اما اضافه کردن اکسین به طور معنی‌داری باعث افزایش ظرفیت تشکیل جوانه در نمونه‌های برگی در *D. minor* L. گردیده است (۱۸).

IBA یکی از هورمون‌های رایج در القای ریشه می‌باشد، این هورمون به ویژه در غلظت‌های پایین (mgl^{-1} ۱ معادل ۵ میکرو مولار) در بسیاری از گیاهان برای مثال Bamboo یک اکسین مناسب تلقی می‌گردد (۲). در این تحقیق از این هورمون در دو غلظت mgl^{-1} ۰/۵ و ۱ استفاده گردید که این دو غلظت از لحاظ آماری در القای ریشه تفاوت معنی‌داری با هم نداشته‌اند. این در حالی است که در مطالعه صورت گرفته در گیاه *D. lanata* با استفاده از هورمون‌های NAA و BAP، محیط کشت MS حاوی mgl^{-1} ۶NAA و mgl^{-1} BAP ۳ به عنوان بهترین محیط برای ریشه‌دهی معرفی شده است (۷).

منابع

1. Adib, A. and T. Ghafghazi. 1991. Basic and clinical pharmacognosy. Alborz Tehran Press. 349 pp.

2. Alagumanian, S., V.S. Perumal, R. Balachandar, K. Rameshkannan and M.V. Rao. 2004. Plant regeneration from leaf and stem explants of *Solanum trilbatum*. Current Science, 86: 1478-1480.
3. Asemota, O., C.R. Eke and J.O. Odewale. 2007. Date palm (*Pheonix dactylifera* L.) in vitro morphogenesis in response to growth regulators, source and nitrogen. African Journal of Biotechnology, 6: 2353-2357.
4. Azadbakht, M. and N. Ghasemi Dehkordi. 2001. Determination of cardiac glycosides in *D. nervosa* by HPLC method. Mazandaran University of Medical Science, 31: 25-30.
5. Dey, P.M., J.B. Harborn and K. Hostettmann. 1991. Method in plant biochemistry. London: Academic Press Ld. 6: 335, 344, 346-347.
6. Diettrich, B., H. Mertinat and M. Luckner. 1990. Formation of *Digitalis lanata* clone lines by shoot tip culture. Planta Medica, 56: 53-58.
7. Fatima, Z., A. Mojib, S. Fatima, A. Arshi and S. Umar. 2009. Callus induction, biomass growth and regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh: influence of plant growth regulators and carbohydrates. Journal of Biotechnology, 33: 1-13.
8. Fuentes, S.R.L., M.B.P. Calheiros, J. Manetti-Filho and L.G.E. Vieira. 2000. The effect of silver nitrares and different carbohydrates sources on somatic embryogenesis in coffee canephora. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60: 5-13.
9. Fujii, Y., Y. Ikeda and M. Yamazaki. 1994. High-performance liquid chromatography determination of lanatosides in *Digitalis lutea* and *Digitalis ambigua* leaves. Journal Liq Chromatogram, 17: 4451-4461.
10. Ghasemi, N. and M. Azadbakht. 1994. *Digitalis* species of Iran. Razi Pharmaceutical Journal, 11: 35-36.
11. Goldin, A.G. and A.R. Safa. 1984. *Digitalis* and cancer. Lancet, 8386:1134.
12. Hagimori, M., T. Matsumoto and T. Kiaski. 1980. Determination of digitoxin and digoxin contents in first and second passage calli and organ redifferentiating calli of several *Digitalis* species by radioimmunoassay. Plant Physiology, 21: 1391-1063.
13. Hagimori, M., T. Matsumoto and Y. Mikami. 1984[a]. Photoautotrophic culture of undifferentiated cells and shoot forming cultures of *Digitalis purpurea* L., Plant Cell Physiology, 25: 1099-1102.
14. Hagimori, M., T. Matsumoto and Y. Mikami. 1984[b]. Jar fermenter culture of shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. using a revised medium. Agricultural and Biological Chemistry, 48: 956-970.
15. Hebel, S.K. and O.J. Cada. 2001. Drug Facts and Comparisons. New York. 179-183.
16. Palazon, J., M. Bonfill, R.M. Cusido, M.T. Pinol and C. Morales. 1995. Effect of auxin and Phenobarbital on morphogenesis and production of digitoxin in *Digitalis* callus. Plant Cell Physiology, 36(2): 247-252.
17. Perez-Bermudez, P., M.J. Cornejo and J. Segura. 1983. In vitro propogaion of *Digitalis obscura* L. Plant Science Letters, 30: 77-82.
18. Sales, E., S.G. Nebaer, I. Arrillaga and J. Segura. 2002. Plant hormones and agrobacterium tumefaciens strain 82.139 induce efficient plant regeneration in the cardenolide- producing plant *Digitalis minor* Journal of Plant Physiology, 159: 9-16.
19. Smith, R.H. and J.H. Gould. 1989. Introductory essay. In J. Janick(Ed), Classic Papers in Horticultural Science, pp: 52-90.

Tissue Cultur Studty in Foxglove Plant (*Digitalis Nervosa* Staud & Hochst)

Marzieh Karimi[1], Seyed Kamal Kazemitabar[2], Mohammad Azad Bakht[3] and Ghorbanali Nematzadeh[4]

1- Former M.Sc. Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (Corresponding author: mr.karimi83@gmail.com)
2 and 4- Associate Professor and Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3- Professor, Mazandaran University of Medical Sciences
Received: December 20, 2010 Accepted: March 15, 2011

Abstract

Different tissue culture techniques of *Digitalis nervosa* staud & Hochst were studied. In this study, different kinds of plant growth regulators and sources of carbon (sucrose, galactose, fructose and maltose) were used to investigate the callus induction by leaf explants. Growth regulators 2,4-D and NAA at three levels and BA at two levels were applied. Murashige and Skoog culture medium supplemented with sucrose, 0.5 mgl^{-1}BA and 1 mgl^{-1} NAA was found to be the best treatment for callus induction from leaf explants. In comparison with other culture media callus was appeared sooner on MS medium containing 1 mgl^{-1} BA, 1 mgl^{-1} NAA and 2 mgl^{-1} 2,4-D. The cotyledon explants were the best samples for callus induction compared with the other explants (leaf, hypocotil and root). Hormones BA and NAA were used to investigate plantlet regeneration from leaf based callus. Treatment containing 2 mgl^{-1} BA was the best choice to shoot regeneration from leaf explant. Murashige and Skoog culture medium acted better than B5 for regeneration. Hormone IBA was used at two levels (0.5 and 1 mgl^{-1}) for root induction. It was determined that there is no significant difference between these two treatments.

Keywords: *Digitalis Nervosa* Staud & Hochst, Callus, Regeneration, Rooting, Cardiac Glycosides