مطالعه باززایی مستقیم و غیر مستقیم در گونه‌های *Digitalis lanata* و *D. purpurea* در شرایط درون شیشه

محمود تقیئی[۱]، مجید طالبی[۲*] و بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۷)

چکیده

گل انگشتانه (*Digitalis* sp.) به‌عنوان یک گیاه زینتی و دارویی در درمان نارسایی‌های احتقانی قلب استفاده می‌شود. استفاده از کشت بافت و سلول گیاهی، در ریزازدیادی و تولید پایدار ترکیبات دارویی در مقیاس وسیع بسیار مؤثر است. در این پژوهش روش‌های باززایی مستقیم و غیر مستقیم در دو گونه *D. purpurea* و *D. lanata* تحت تیمارهای مختلف اکسین و سیتوکنین مورد بررسی قرار گرفت. در روش غیر مستقیم جوانه‌زنی فقط در گونه *D. lanata* و در پاسخ به سه میلی‌گرم در لیتر BAP رخ داد و هیچ‌گونه باززایی در کالوس‌های گونه *D. purpurea* صورت نگرفت. استفاده از ۱۳ ترکیب هورمونی مختلف جهت باززایی مستقیم ریزنمونه گره نشان داد که در هر دو گونه، بهترین باززایی در محیط‌های MS حاوی هورمون BAP حاصل می‌شود. تعداد شاخه‌های حاصل در روش مستقیم در گونه *D. purpurea* بیشتر بود و پاسخگویی آن به محیط‌های مختلف کشت، سریع‌تر صورت می‌گیرد. نتایج نشان داد که میزان فنل تولید شده در هر دو گونه در کشت جوانه و باززایی مستقیم بسیار کمتر از کشت برگ در باززایی غیر مستقیم است. شاخه‌های حاصل در محیط‌های بدون اکسین و حتی حاوی یک میلی‌گرم در لیتر زآتین نیز ریشه‌زایی کردند و سپس به خاک منتقل شدند. با توجه به میزان تولید فنل بسیار اندک و نیز ایجاد تعداد شاخساره‌های بسیار بیشتر در کشت‌های جوانه هر دو گونه، این روش ترجیح داده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: گل انگشتانه، باززایی، کشت بافت، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی

۱، ۲ و ۳. به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
*: مسئول مکاتبات: پست الکترونیکی: mtalebi@cc.iut.ac.ir

مقدمه

گل انگشتانه (*Digitalis*. sp) که به‌سبب شکل خاص گل‌هایش دستکش روباه نیز نامیده می‌شود، متعلق به خانواده *Scrophulariacae* است. جنس *Digitalis* از این خانواده به ۲۰-۱۲ گونه تقسیم می‌شود و گونه‌های مختلف این جنس عموماً یک‌ساله و علفی و گاهی درختچه‌های چند ساله هستند (۱۲). این گیاه به‌عنوان یک گیاه زینتی در فضای سبز استفاده می‌شود. وجود گل‌های متنوع به رنگ‌های قرمز، ارغوانی و سفید با لکه‌های قهوه‌ای رنگ داخل کاسه گل‌ها، جذابیت آن را برای استفاده در فضای سبز بیشتر کرده است. علاوه‌بر این، برگ گونه‌های مختلف این جنس، حاوی ترکیبات گلیکوزیدی قلبی (کاردنولید) هستند که تاکنون تنها ۲۳ نوع مختلف آن در عصاره‌های حاصل از گونه *D. purpurea* شناخته شده است (۱۸). استفاده از عصاره *D. purpurea* جهت درمان نارسایی‌های قلبی اولین بار توسط ویلیام ویترینگ شرح داده شد. در میان ترکیبات گلیکوزیدی حاصل از این گیاهان، دیگوکسین و دیجیتوکسین هنوز هم به‌عنوان داروهایی مفید در درمان نارسایی‌های احتقانی قلب استفاده دارند. علاوه‌بر این نتایج، جدیدترین مطالعات اپیدمیولوژیک خواص ضد سرطانی (به‌خصوص سرطان‌های سینه و پروستات) این ترکیبات را نیز آشکار ساخته‌اند (۱۷، ۲۳ و ۳۲). تولید شیمیایی گلیکوزیدهای قلبی به‌دلیل داشتن ساختار بزرگ و ناپایدار، مستلزم صرف هزینه و زمان نسبتاً زیادی است و لذا این روش تولید، مقرون به صرفه نیست و در نتیجه مهم‌ترین منبع تولید این ترکیبات، برگ گونه‌های مختلف جنس *Digitalis* خواهد بود (۱۷). تولید تجاری این متابولیت‌ها از طریق کشاورزی سنتی نیز محدودیت‌های گوناگونی دارد (۲، ۱۴ و ۲۴) و محتوای گلیکوزیدهای قلبی حاصل از این روش به‌شدت تحت تأثیر شرایط اقلیمی و خاک قرار می‌گیرد (۲۷). کشت بافت و سلول گیاهی در مقیاس وسیع می‌تواند جایگزینی مناسب جهت تولید پایدار گونه‌های حاوی این ترکیبات و ریزازدیادی آن باشد و این موضوع سبب شده است که توجه بسیاری از پژوهشگران به‌ویژه در دو دهه اخیر، به کشت درون شیشه‌ای گونه‌های مختلف جنس *Digitalis* معطوف شود (۱، ۹، ۱۱، ۱۵، ۱۶، ۲۵، ۲۶، ۲۸ و ۳۱). مواد مغذی و تنظیم‌کننده‌های مختلف رشدی علاوه‌بر این که میزان تولید کاردنولیدها را در شرایط درون شیشه‌ای تحت تأثیر قرار می‌دهند، بر باززایی گیاهان نیز مؤثرند. برای مثال اثرات سوکروز، مالتوز، گلوکز، گالاکتوز و مانیتول بر روی رشد ریزنمونه‌های هیپوکوتیل گونه *D. obscura* مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که سوکروز نقشی دو گانه در اندام‌زایی ایفا می‌کند. بدین صورت که هم نقش اسمزی و هم نقش انرژی‌زایی را بر عهده دارد (۲۶). رشد کالوس در گونه *D. purpurea* به‌وسیله حضور اکسین و سیتوکینین خارجی به‌ترتیب به نسبت ۲:۱ افزایش می‌یابد و تشکیل جوانه و ساقه در ریزنمونه های برگی و کشت‌های کالوس این گونه، تحت اثر ۵-۱ میلی‌گرم در لیتر از سیتوکینین ۲-iP رخ می‌دهد (۳).

از میان تنظیم‌کننده‌های رشدی که بیشترین اثر را بر اندام‌زایی دارند، به نظر می‌رسد که اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها دارای بیشترین سهم هستند. به‌طورکلی انواع مختلف سیتوکینین، ساقه‌زایی و تمایزیابی جوانه نابه‌جا را جهت باززایی تقویت می‌کنند و انواع مختلف اکسین نیز تمایزیابی مستقیم ریشه در ساقه‌های باززا شده را افزایش می‌دهند، اما با توجه به گونه مورد تحقیق، نوع اکسین یا سیتوکینین مورد استفاده که بیشترین تأثیر را بر اندام‌زایی دارند، متفاوت است. به‌عنوان مثال در تحقیقی که بر روی ساقه‌زایی مستقیم گونه *D. trojana* صورت گرفت مشخص شد که NAA و BAP بهترین تنظیم‌کننده‌های رشدی جهت باززایی و تکثیر ساقه‌اند (۶)، حال آنکه بهترین ترکیب هورمونی جهت باززایی کارامد ساقه در گونه *D. davisiana* استفاده از ترکیب TDZ و IAA است (۱۰). بررسی اثرات جیبرلیک اسید بر روی اندام‌زایی و تجمع کاردنولید در کشت های درون شیشه ای گونه *D.obscura* نشان می‌دهد که صرف نظر از نوع ریزنمونه، جیبریلیک اسید به تنهایی باعث تحریک اندام‌زایی نمی‌شود اما واکنش‌های

اندام‌زایی که به‌وسیله اکسین یا سیتوکینین تقویت می‌شوند را تغییر می‌دهد، بدین صورت که از اندام‌زایی جلوگیری اما تشکیل جنین را بهبود می‌بخشد (۹). علاوه‌بر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، نوع ریزنمونه (برگ، هیپوکوتیل، نوک ساقه و ریشه)، سن گیاه مادری که از آن ریزنمونه برداشت می‌شود و تأثیر متقابل ریزنمونه و نوع تنظیم‌کننده‌های رشدی نیز بر پاسخ اندام‌زایی ریزنمونه‌ها مؤثرند (۲۰ و ۲۸). در این مطالعه اثر تنظیم‌کننده‌های مختلف رشدی بر اندام‌زایی گونه‌های *D. lanata* و *D. purpurea* مورد ارزیابی قرار گرفته و بهترین روش جهت ریز ازدیادی این دو گونه در شرایط درون شیشه (*in vitro*) معرفی می‌شود.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی، ضدعفونی و کشت ریزنمونه‌ها

این آزمایش طی سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شد. بذرهای گونه *D. purpurea* از گلخانه آموزشی/پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان جمع‌آوری شد. بذرهای گونه *D. lanata* نیز توسط دانشکده علوم دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. جهت ضدعفونی سطحی، بذرها به‌مدت پنج تا ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد (V/V) به‌همراه یک قطره محلول توئین ۲۰ جهت افزایش اثر ماده ضدعفونی کننده قرار داده شدند و سپس در شرایط استریل و زیر هود به‌مدت ۱۵ دقیقه در آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. تعداد ۱۰ عدد از بذرهای ضدعفونی شده هر گونه درون شیشه‌های درپیچ‌دار و حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS موراشیگ و اسکوگ (۲۱) و بدون هیچ‌گونه تنظیم کننده رشدی قرار داده شدند. برگ و گره‌های حاصل از گیاهچه‌های هر دو گونه به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمایش‌های کشت بافت

جهت انجام باززایی غیر مستقیم نیز ابتدا ریزنمونه‌های برگی از هر دو گونه در شرایط استریل از گیاهان مادری جدا شدند و در محیط MS حاوی غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکینین در سه تکرار کشت شدند (جدول ۱). جهت جلوگیری از سیاه شدن ریزنمونه‌های برگی، از دو تیمار پنج میلی‌گرم در لیتر ویتامین ث و دو میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره در محیط‌های کشت استفاده شد. پس از ۲۰-۱۵ روز از تاریخ کشت، کالوس‌های حاصل جهت باززایی و ایجاد گیاهچه وارد محیط‌هایی با غلظت سه، چهار، پنج و شش میلی‌گرم در لیتر BAP شدند.

جهت انجام باززایی مستقیم، پس از پنج هفته از کشت بذرها و ایجاد گیاهچه‌های با رشد کافی، ریزنمونه‌های گره گونه *D. purpurea* در ۱۵ محیط حاوی غلظت‌های مختلف (۶-۱ میلی‌گرم در لیتر) سیتوکینین (BAP، زآتین و Kin) و غلظت ثابت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و در سه تکرار کشت شدند و پس از چهار هفته تعداد شاخه‌های حاصل از هر تیمار شمارش و ثبت شدند (جدول ۲). پس از ۱۲ هفته از کشت بذرهای گونه *D. lanata*، گیاهچه‌های حاصل در محیط MS حاوی پنج میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک واکشت شدند تا با افزایش فاصله میان‌گره، تعداد کافی گره به‌عنوان ریزنمونه جهت باززایی در اختیار قرار گیرد. تیمارهای اعمال شده با تیمارهای اعمال شده در گونه *D. purpurea* مشابه بود (جدول ۲). تمامی کشت‌ها در شرایط دمایی ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی انجام شدند. شاخه‌های تولید شده در هر تیمار پس از رسیدن به رشد کافی (طول ۶ - ۴ سانتی‌متر) شمارش شدند.

شاخه‌های حاصل از هر دو نوع روش در هر دو گونه در شرایط استریل جداسازی و جهت ریشه‌زایی در محیط کشت MS حاوی صفر تا سه میلی‌گرم در لیتر IBA (سه تکرار) قرار داده شدند.

پس از رشد مناسب و ریشه‌دهی گیاهچه‌های گل انگشتانه‌ای، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به گلدان‌های کوچک حاوی نسبت‌های مساوی شن، خاکبرگ، پیت‌ماس و خاک منتقل و جهت سازگاری با محیط طبیعی وارد گلخانه شدند.

جدول ۱. نتایج مقایسه میانگین کالوس‌دهی در دو گونه *D. purpurea* و *D. lanata* براساس مقیاس هوکرنی- برز پس از ۳۰ روز

تیمار	تنظیم کننده رشدی (mg/l)	تولید کالوس در *D. purpurea*	تولید کالوس در *D. lanata*
۱	۰	۰^{m}	۰^{o}
۲	BAP (۰/۱ mg/l) + NAA (۱ mg/l)	۱۹^{cd}	۹/۷۵^{e}
۳	BAP (۰/۵ mg/l) + NAA (۱ mg/l)	۱۵/۵^{gf}	۷/۷۵^{gh}
۴	BAP (۱ mg/l) + NAA (۱ mg/l)	۲۱/۵^{ab}	۶/۲۵^{ij}
۵	BAP (۳ mg/l) + NAA (۶mg/l)	۲۳^{a}	۱۱/۲۵^{d}
۶	BAP (۴ mg/l) + NAA (۶mg/l)	۲۳^{a}	۹/۵^{ef}
۷	BAP (۳ mg/l) + IAA (۶ mg/l)	۱۲^{ij}	۳/۷۵^{k}
۸	BAP (۴ mg/l) + IAA (۶ mg/l)	۱۰/۵^{jk}	۲/۲۵^{lmn}
۹	BAP (۳ mg/l) + NAA (۶mg/l) + VC (۵ mg/l)	۲۰/۷۵^{bc}	۱۵^{a}
۱۰	BAP (۴ mg/l) + NAA (۶mg/l) + VC (۵ mg/l)	۲۰/۷۵^{bc}	۱۳/۷۵^{ab}
۱۱	BAP (۳ mg/l) + NAA (۶mg/l) + $AgNO_3$ (۲ mg/l)	۱۲/۷۵^{hi}	۵/۷۵^{ij}
۱۲	BAP (۴ mg/l) + NAA (۶mg/l) + $AgNO_3$ (۲ mg/l)	۱۴/۵^{gh}	۸/۲۵^{fg}
۱۳	BAP (۰/۵ mg/l) + IAA (۰/۵ mg/l)	۷^{l}	۱/۵^{mn}
۱۴	BAP (۰/۵ mg/l) + IAA (۱mg/l)	۸/۷۵^{kl}	۱/۲۵^{no}
۱۵	BAP (۰/۵ mg/l) + IAA (۲ mg/l)	۸/۵^{l}	۲/۷۵^{klm}
۱۶	BAP (۰/۵ mg/l) + IAA (۳mg/l)	۸/۵^{l}	۳^{kl}
۱۷	BAP (۰/۵ mg/l) + NAA(۰/۵ mg/l)	۱۶/۵^{ef}	۵/۲۵^{j}
۱۸	BAP (۰/۵ mg/l) + NAA (۱mg/l)	۱۸/۲۵^{de}	۶/۷۵^{hi}
۱۹	BAP (۰/۵ mg/l) + NAA (۲ mg/l)	۲۱/۲۵^{ab}	۱۱/۷۵^{cd}
۲۰	BAP (۰/۵ mg/l) + NAA (۳mg/l)	۲۲/۷۵^{a}	۱۳^{bc}

حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد را نشان می‌دهند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

کالوس‌زایی براساس مقیاس هوکرنی برز (۱۷ و ۱۸)، شمارش تعداد شاخه‌ها و درصد ریشه‌زایی در آزمایشگاه انجام و سپس در برنامه نرم‌افزار EXCEL ذخیره شد. کلیه آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی توسط برنامه‌های نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شد و اثر ژنوتیپ و تیمارهای هورمونی بر کالوس‌زایی و باززایی آنها (روش غیر مستقیم) و شاخه‌زایی (باززایی مستقیم) در گونه‌های *D. lanata* و *D. purpurea* تعیین شد.

نتایج و بحث

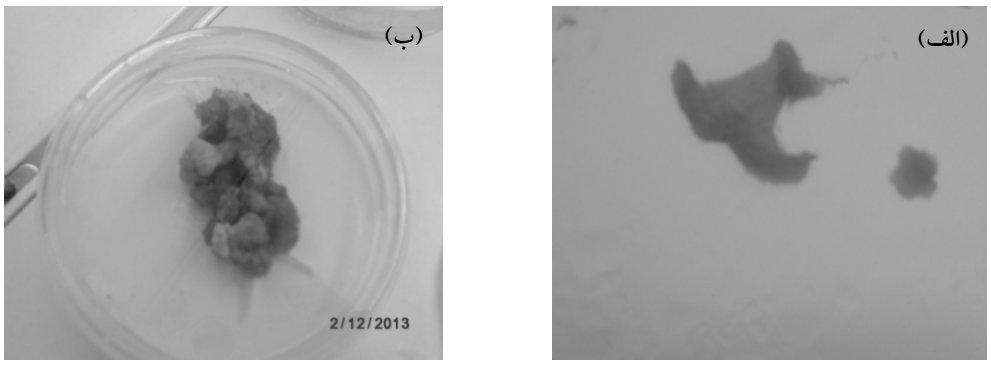
کالوس‌دهی و باززایی غیر مستقیم

نتایج حاصل از محیط کشت‌های حاوی ترکیبات مختلف از انواع اکسین و سیتوکینین در غلظت‌های گوناگون، در ریزنمونه‌های برگی دو گونه *D. lanata* و *D. purpurea*، وضعیت کالوس‌دهی متفاوت در ریزنمونه‌های برگی دو گونه مورد آزمایش را نشان داد (جدول ۱)، به‌طوری‌که ریزنمونه‌های برگی گونه *D. purpurea* در واکنش به مقادیر بسیار جزئی اکسین (۰/۵-۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و مقادیر بسیار بالاتر

جدول ۲. میانگین تعداد جوانه به‌ازای هر گره در دو گونه *D. purpurea* و *D. lanata*

تیمار	تنظیم کننده رشدی (mg/l)	تعداد شاخه در *D. purpurea*	تعداد شاخه در *D.lanata*
۱	بدون تنظیم کننده رشدی	۱/۷۵^{e}	۱^{g}
۲	BAP (۱mg/l) + NAA (۰/۱mg/l)	۱۶^{c}	۳/۷۵^{ef}
۳	BAP (۲mg/l) + NAA (۰/۱mg/l)	۲۰/۲۵^{b}	۹^{d}
۴	BAP (۳mg/l) + NAA (۰/۱mg/l)	۴۳/۲۵^{a}	۱۲/۵^{b}
۵	BAP (۴mg/l) + NAA (۰/۱mg/l)	۴۱/۲۵^{a}	۱۶/۲۵^{a}
۶	BAP (۵mg/l) + NAA (۰/۱mg/l)	–	۱۱/۲۵^{bc}
۷	BAP (۶mg/l) + NAA (۰/۱mg/l)	–	۱۰/۲۵^{cd}
۸	Zea(۱mg/l) +NAA (۰/۱mg/l)	۴/۷۵^{d}	۸/۷۵^{d}
۹	Zea(۲mg/l) + NAA (۰/۱mg/l)	۶/۷۵^{d}	۲/۲۵^{fg}
۱۰	Zea(۳mg/l) + NAA (۰/۱mg/l)	۱۳/۲۵^{c}	۲/۲۵^{fg}
۱۱	Zea(۴mg/l) + NAA (۰/۱mg/l)	۱۹/۲۵^{b}	۵^{e}
۱۲	Kin (۱mg/l) + NAA (۰/۱mg/l)	۱/۷۵^{e}	۴/۵^{e}
۱۳	Kin (۲mg/l) + NAA (۰/۱mg/l)	۱/۷۵^{e}	۱/۲۵^{e}
۱۴	Kin (۳mg/l) + NAA (۰/۱mg/l)	۴/۲۵^{de}	۲/۲۵^{fg}
۱۵	Kin (۴mg/l) + NAA (۰/۱mg/l)	۵^{d}	۲/۲۵^{fg}

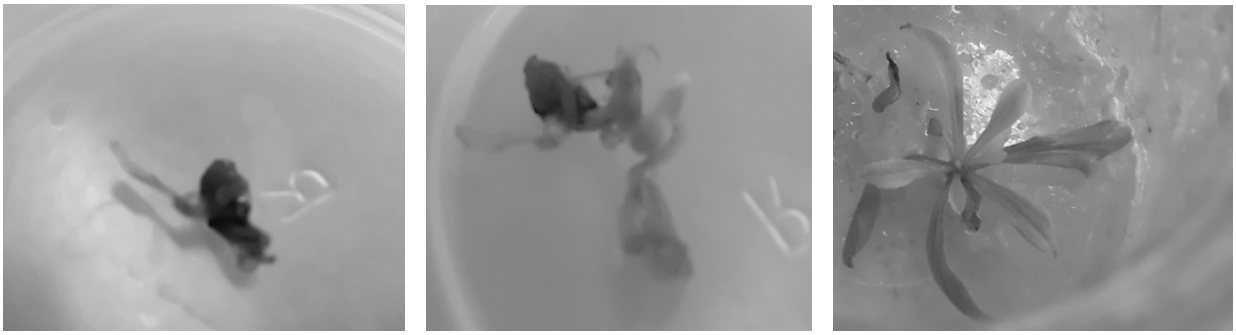
حروف غیر مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد را نشان می‌دهند.



شکل ۱. کالوس‌دهی در ریزنمونه‌های برگی گونه‌های الف) *D. lanata* و ب) *D. purpurea*

سیتوکینین (۱۰ میلی‌گرم در لیتر BAP) نیز کالوس‌های بزرگی تولید کردند، درحالی‌که مطلوب‌ترین کالوس‌دهی در گونه *D. lanata* در اثر اعمال ۶ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل شد (جدول ۱ و شکل ۱). این در صورتی است که مطالعات پیشین غلظت بالای اکسین‌ها و از جمله NAA را در تحریک تشکیل کالوس در ریزنمونه برگی گونه‌های مختلف گل انگشتانه‌ای مؤثر دانسته‌اند (۸) و این نتیجه تأثیر ژنوتیپ در واکنش به شرایط محیط کشت را نشان می‌دهد.

باید توجه داشت که کالوس‌های سالم و فعال (بیشتر در



شکل ۲. مراحل باززایی غیر مستقیم در گونه *D. lanata*

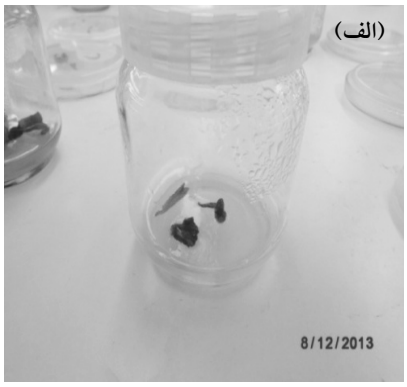
گونه *D. lanata*)، در محیط‌های حاوی مواد جاذب یا بازدارنده سنتز فنل (ویتامین ث و نیترات نقره) حاصل شدند. در محیط‌های بدون جاذب فنل نیز کالوس‌زایی حاصل شد اما به‌طور هم‌زمان، سیاه شدن نیز شروع شد.

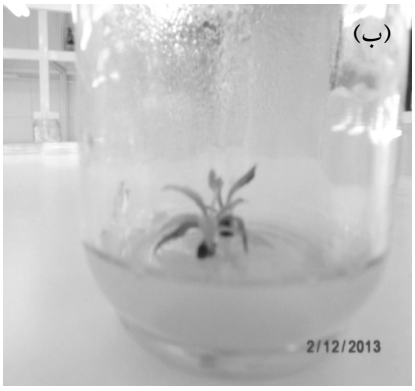
باززایی در گونه‌های مختلف *Digitalis* تحت اثر سیتوکینین‌های مختلفی رخ می‌دهد (۴ و ۱۰)، اما به‌طورکلی بیش از ۹۸ درصد باززایی هنگامی صورت می‌گیرد که ریزنمونه برگی در محیط MS حاوی سه میلی‌گرم در لیتر BAP کشت شود (۵). بهترین محیط کشت جهت باززا شدن کالوس‌ها در گونه *D. lanata*، محیط MS حاوی‌شش میلی‌گرم در لیتر BAP معرفی شده است (۸). در مطالعه حاضر بهترین باززایی در کالوس‌های گونه *D. lanata*، در محیط کشت حاوی سه میلی‌گرم در لیتر BAP حاصل آمد و غلظت‌های بیش از پنج میلی‌گرم در لیتر BAP از تشکیل پریموردیوم ساقه جلوگیری کرد. کالوس‌های حاصل در ابتدا زرد روشن بودند و سپس به سبز تیره تغییر رنگ دادند و سرانجام سرآغازه‌های برگ شروع به تشکیل کردند (شکل ۲). کالوس‌های حاصل از گونه *D. purpurea* همگی در واکنش به غلظت‌های بالای سیتوکینین صرفاً افزایش حجم نشان دادند و باززایی صورت نگرفت. این موضوع ثابت شده است که باززایی در کالوس‌هایی که مسیر افزایش حجم را در پیش می‌گیرند، مطلوب نخواهد بود (۱۹).

کشت ریزنمونه گره و باززایی مستقیم

اثر غلظت‌های مختلف (۶-۱) میلی‌گرم بر لیتر انواع هورمون سیتوکینین (BAP، زآتین و Kin) در تکثیر ریزنمونه‌های گره دو گونه *D. lanata* و *D. purpurea* آزمایش شدند (جدول ۲). کشت ریزنمونه‌های برگ و گره گونه *D. lanata* در محیط کشت MS بدون هیچ‌گونه جاذب ترکیبات فنلی نشان داد که پس از ۲۰ روز، همگی ریزنمونه‌های برگی سیاه شده و از بین رفتند. این در صورتی است که ریزنمونه‌های گره کشت شده در این محیط‌ها علائم خاصی از سیاه‌شدگی نداشتند (شکل ۳). گل انگشتانه‌ای گونه‌ای مستعد در تولید ترکیبات فنلی است. جدا کردن برگ و دیگر اندام‌ها از گیاه مادری سبب اکسید شدن این ترکیبات توسط پلی‌فنل اکسیدازها و قهوه‌ای یا سیاه شدن بافت‌ها می‌شود. محصولات این اکسیداسیون سبب توقف فعالیت آنزیمی، تیره شدن بافت‌ها، عدم تثبیت ریزنمونه در محیط کشت و در نهایت مرگ ریزنمونه می‌شود (۲۲). استفاده از نیترات نقره ($AgNO_3$) در غلظت‌های ۳ – ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، سبب کاهش سیاه‌شدگی ریزنمونه‌های برگی شد، اما تقریباً از تولید کالوس جلوگیری کرد.

در تحقیق حاضر مشخص شد که جنبه‌های مختلف کشت درون شیشه‌ای این دو گونه از جنس *Digitalis* با یکدیگر متفاوت‌اند. یکی از این جنبه‌ها، تعداد شاخساره‌های حاصل از کشت مستقیم (کشت گره) است به گونه‌ای که نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها (تعداد شاخساره‌های حاصل)، نمایانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در بعضی از تیمارهای اعمال شده در این دو گونه است (جدول ۲)، همچنین پاسخگویی ریزنمونه‌های گره گونه *D. purpurea* با سرعت بالاتری صورت





شکل ۳. تفاوت در تولید فنل در ریزنمونه های الف) برگ و ب) جوانه گونه *D. lanata* پس از ۲۰ روز از تاریخ کشت

شکل ۴. افزایش فاصله میان‌گره‌ای گونه *D. lanata* در پاسخ به پنج میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک

گرفت. با توجه به این که دوره رشد رزتی گونه *D. lanata* طولانی‌تر از گونه دیگر مورد تحقیق در این پژوهش است، لذا جهت به‌دست آوردن گره، دانهال‌های حاصل در محیط MS حاوی پنج میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک واکشت شدند و پس از ۲۵ روز از تاریخ کشت و افزایش فاصله میان‌گره‌ای (شکل ۴)، گره‌های حاصل جهت باززایی مستقیم مورد استفاده قرار گرفتند.

بیشترین تعداد شاخساره در کشت گره گونه *D. purpurea* درتیمار با سه میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد و در گونه *D. lanata* نیز، بیشترین تعداد شاخساره و با رشد مناسب در محیط MS حاوی چهار میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱میلی‌گرم در لیتر NAA به‌وجود آمد. غلظت‌های بیش از پنج میلی‌گرم در لیتر BAP نیز در هیچ‌یک از دو گونه مورد بررسی، تأثیر مثبتی در افزایش تعداد جوانه‌های حاصل از کشت گره نداشتند. محیط‌های فاقد هورمون سیتوکینین به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. از بین تمامی ریزنمونه‌های گره گونه *D. purpurea* کشت شده در این محیط‌های کشت، تنها دو گیاهچه حاصل آمد و هیچ‌یک از ریزنمونه‌های گره گونه *D. lanata* در این محیط‌ها، رشد کافی و مناسب از خود بروز ندادند. در هیچ کدام از کشت‌های ریزنمونه گره از مواد جاذب فنل استفاده نشد اما پدیده سیاه‌شدگی و از بین رفتن ریزنمونه‌ها نیز رخ نداد. در کشت‌های کالوس گونه *D. purpurea*، باززایی در هیچ‌یک از تیمارها صورت نگرفت و در گونه *D.lanata* بیشترین تعداد شاخه در اثر تیمار با غلظت سه میلی‌گرم در لیتر BAP و به

تعداد سه شاخه به‌ازای هر کالوس تولید شد. این نتایج می‌تواند دلیلی بر برتری کشت جوانه و باززایی مستقیم نسبت به باززایی غیر مستقیم باشد.

در مطالعات اخیر نیز بهترین روش جهت تکثیر گونه *D. purpurea* استفاده از کشت گره در باززایی مستقیم معرفی شده است (۱۳). با توجه به این که هدف نهایی از تکثیر این گونه‌های گیاهی، دسترسی به بیوماس گیاهی بیشتر جهت رسیدن به مواد مؤثره بیشتر است، استفاده از ریزنمونه گره در تکثیر مستقیم می‌تواند مفیدتر باشد، ضمن آن که در روش کشت جوانه با احتمال بیشتر، ثبات ژنتیکی گیاهان حاصل نسبت به گیاهان مادری نیز حفظ می‌شود (۳۰).

تعیین بهترین سیتوکینین در تولید شاخساره

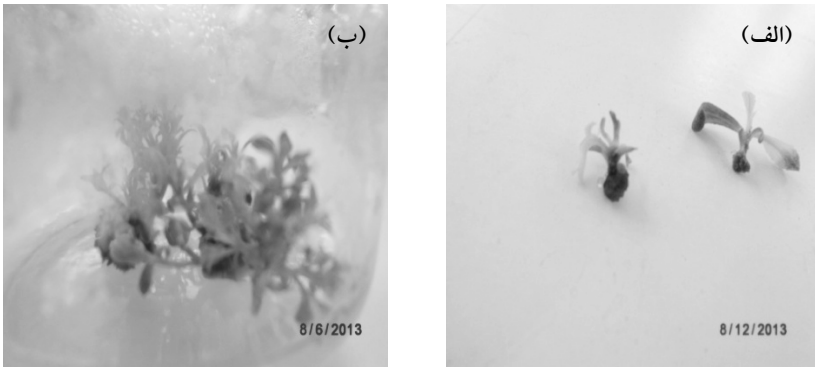
به‌طورکلی اثر هورمون BAP بر تعداد شاخه تولید شده در هر دو گونه بیشتر از دو نوع سیتوکینین دیگر بود (جدول ۲). استفاده از BAP در گونه *D. purpurea* و در غلظت سه میلی‌گرم در لیتر سبب ایجاد شاخه‌های بسیار زیاد و متراکم شد و با شدت کمتر در گونه *D. lanata* مؤثر واقع شد. در حقیقت در گونه *D. lanata* به مقادیر بالاتر BAP (۴تا ۵ میلی‌گرم در لیتر) جهت دستیابی به بیشترین تعداد جوانه نیاز است. در این پژوهش هورمون زآتین در هر دو گونه مورد آزمایش، در مرتبه دوم اهمیت از لحاظ تعداد شاخه تولید شده قرار گرفت. شاخه‌های تولید شده در اثر تیمار با این هورمون طول کمتر و رنگ سبزتری نسبت شاخه‌های حاصل از تیمار با BAP داشتند، همچنین گیاهچه‌های حاصل از تیمار با یک میلی‌گرم در لیتر زآتین پس از پنج هفته از شروع کشت، ریشه‌زایی کردند. برخی گزارش‌ها نیز هورمون زآتین را پس از BAP مهم‌ترین سیتوکینین در تکثیر شاخه می‌دانند (۳۰)، درصورتی‌که بعضی دیگر از منابع کینیتین را پس از BAP مؤثرترین هورمون جهت تکثیر شاخه می‌دانند (۷ و ۲۹). تعداد شاخه تولید شده در گونه *D. lanata* در تیمار با غلظت چهار میلی‌گرم در لیتر کینیتین تقریباً با تعداد شاخه تولید شده در تیمار با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، برابر بود.

با وجود اینکه نتایج حاصل از پژوهش حاضر، تیمار MS حاوی سه میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱میلی‌گرم در لیتر NAA را مناسب‌ترین محیط جهت به‌دست آوردن حداکثر ساقه‌چه در گونه *D. purpurea* معرفی می‌کند، اما شاخه‌های حاصل از این محیط نسبت محیط‌های دیگر متراکم‌تر و کوتاه‌تر هستند. شاخه‌های حاصل ازتیمار MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA طول بسیار بلندتری نسبت به محیط‌های دیگر دارند و جدا کردن گیاهچه‌های مستقل از آنها بسیار راحت‌تر صورت می‌گیرد، به‌طوری‌که نیاز به انتقال گیاهچه‌ها به محیط مناسب جهت طویل شدن نیست. این پدیده احتمالاً مربوط به نزدیک بودن فاصله غلظت اکسین و سیتوکینین است. این در صورتی است که گیاهچه‌های حاصل از گونه *D. lanata* در محیط MS +۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ماندگاری طولانی نداشته و پس از مدتی به زردی گراییده و پژمرده می‌شوند (شکل ۵).

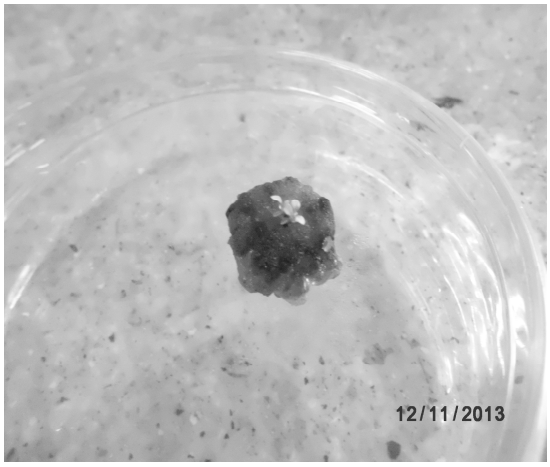
تیمار هم‌زمان با غلظت‌های متعادل اکسین و سیتوکینین سبب باززایی می‌شوند. نتایج حاصل نشان داد که استفاده از مقادیر بالاتر از پنج میلی‌گرم در لیتر BAP سبب ایجاد شاخه‌های بسیار زیاد و متراکم می‌شود و رشد عادی گیاهچه را متوقف می‌کند. افزودن اکسین سبب تسریع در روند شاخه‌زایی نمی‌شود اما استفاده از آن در مقادیر محدود (۰/۵- ۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث توقف اثر بازدارنده سیتوکینین‌ها بر رشد طولی شاخه‌های جانبی شده و رشد ساقه‌ها را عادی می‌کند (۲۹). از سوی دیگر استفاده از اکسین‌ها در مقادیر بالاتر از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر علاوه‌بر بروز ریشه‌دهی در ساقه‌چه‌ها، سبب تولید کالوس نیز می‌شود (شکل ۶) که این پدیده رشد عادی گیاهچه‌ها را متوقف می‌کند؛ بنابراین از مقدار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA، در این پژوهش استفاده شد.

ریشه‌زایی گیاهچه‌های باززا شده

در مطالعه حاضر ریشه‌زایی در تمامی تیمارهای ۳- ۰ میلی‌گرم



شکل ۵. تکثیر شاخه‌های الف) گونه *D. lanata* و ب) گونه *D. purpurea* در محیط MS حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA



شکل ۶. کالوس‌زایی در ساقه‌چه‌های حاصل از کشت گره در محیط حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + یک میلی‌گرم در لیتر زآتین

در لیتر IBA و حتی در تیمارهای یک میلی‌گرم در لیتر زآتین + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA برای شاخه‌زایی، نیز به‌طور ۱۰۰ درصد صورت گرفت. می‌توان دریافت که گل انگشتانه‌ای گیاهی سهل ریشه‌زا است؛ در مطالعات صورت گرفته پیشین در مورد گونه‌های دیگر این جنس نیز پدیده ریشه‌زایی در محیط‌های بدون اکسین و یا مقادیر بسیار اندک اکسین (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA) نیز حاصل شده است (۸ و ۱۰) .

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که بیشترین تعداد شاخساره در هر دو گونه، در استفاده از ریزنمونه‌های گره در باززایی مستقیم حاصل خواهند شد. تعداد گیاهچه‌های حاصل از گونه *D. purpurea* بیشتر از گونه *D. lanata* بود. بهترین ترکیب هورمونی جهت باززایی کشت‌های جوانه نیز سه تا چهار میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱میلی‌گرم در لیتر NAA شناخته شد، همچنین برخلاف ریز نمونه‌های برگی، میزان تولید فنل هنگام استفاده از ریزنمونه‌های گره، به‌شدت کاهش می‌یابد. با توجه به اینکه تولید متابولیت‌های دارویی در این گونه‌ها با تمایز بافتی همسو است و از طرفی ثبات ژنتیکی در گیاهچه‌های حاصل از کشت جوانه نیز بیشتر است، لذا روش باززایی مستقیم در این گونه‌ها مفیدتر خواهد بود.

منابع مورد استفاده

1. Beale, J. M., H. G. Floss, T. Lehmann and M. Luckner. 1988. Digitoxigenin-3b-O-(b-d-Fucopyranosyl-4-b-d-Glucopyranoside), the main cardenolide of somatic embryos of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry* 27: 3143–3146.
2. Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi and E. Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839–851.
3. Cellarova, E. and R. Honcariv. 1991. The Influence of n-[2-isopentenyl] adenine on shoot differentiation in *Digitalis purpurea* L. tissue cultures. *Acta Biotechnologica* 11: 331-334.
4. Chaturvedi, H. C. and M. Jain. 1994. Restoration of regeneration potentiality in prolonged culture of *Digitalis purpurea* L. *Journal of Plant Biotechnology* 38: 73-75.
5. Christey, M. C. and E. D. Earle. 1991. Regeneration of *Brassica oleracea* from peduncle explants. *Horticultural Science Journal* 26: 1069-1072.
6. Corduk, N. and A. Cuneyt. 2010. Direct shoot organogenesis of *Digitalis trojana* L van.,an endemic medicinal herb of turkey. *African Journal of Biotechnology* 9: 1587-1591.
7. Farsi, M. and J. Zolali. 2003. Introduction to Plant Biotechnology. Ferdowsi University of Mashhad Publication, Mashhad.
8. Fatima, Z., M. Abdul, F. Samar, A. Anjum and U. Shahid. 2009. Callus induction, biomass growth, and plant regeneration in *Digitalis lanata* Ehrh.: influence of plant growth regulators and carbohydrates. *Turkish Journal of Botany* 33: 393-405.
9. Gavidia, I., J. Segura and P. Perez-Bermudez. 1993. Effects of giberellic acid on morphogenesis and cardenolide accumulation in juvenile and adult *Digitalis obscura* cultures. *Journal of Plant Physiology* 142: 373–376.
10. Gurel, E., B. Yucesun, E. Aglic, S. Gurel, S. K. Verma, M. Sokmen, and A. Sokmen. 2011. Regeneration and cardiotonicglycoside production in *Digitalis davisiana* Heywood (Analya Foxglove). *Journal of Plant Biotechnology* 104: 217-225.
11. Hagimori, M., T. Matsumoto and Y. Obi. 1982. Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture. II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Journal of Plant Physiology* 69: 653–656.
12. Hollman, A. 1985. Plant and cardiac glycosides. *British Heart Journal* 54: 258-261.
13. Jitendra, G. P., L. Mahendra, M. Kirti, P. Sayantan, B. Vijay, B. Polavarapo, K. Kavi and D. Tukaram. 2012. *In vitro* propagation and production of cardiotonic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. *Applied Microbiology and Biotechnology* 6: 2379-2393.
14. Kolewe, M. E., V. Gaurav and S. C. Roberts. 2008. Pharmaceutically active natural product synthesis supply plant cell culture technology. *Molecular Pharmaceutics* 5: 243-256.
15. Kubalakova, M., S. Irena and F. J. Novak. 1987. Stability of lanatoside C content in the *in vitro* propagated *Digitalis lanata* clones. *Biologia Plantarum* 29: 7–9.
16. Kuberski, C., H. Scheibner, C. Steup, B. Diettrich and M. Luckner. 1984. Embryogenesis and cardenolide formation in tissue cultures of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry* 23:1407–1412.
17. Lopez-Lazaro, M. 2007. Digitoxin as an anticancer agent with selectivity for cancer cells: possible mechanisms involved. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 11:1043–1053.
18. Luckner, M. and M. Wicht. 2000. *Digitalis.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, pp 213–223 (In German).
19. Moheb Mohammadi, Z. 2011. Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Capsicum annum* using SRAP marker. MSc. Thesis. Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
20. Mehrabi, A. A., M. Omidi, B. E. Seyed Tabatabaei, A. A. Shah Nejet Bushehri and R. Tavakol Afshari. 2002. Study on tissue culture and the effect of neighborhood culture explants of rapeseed (*Brassica napus* L). *Iranian Journal of Agriculture Science* 33: 627- 635. (In Farsi).
21. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologya Plantarum* 15: 473–497.
22. Mustafa, N. R. and R. Verpoorte. 2007. Phenolic compounds in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry* 6: 243-258.
23. Newman, R., P. Yang and A. Pawlus. 2008. Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Molecular Intervention* 8: 36–49.
24. Omidbeigi, R. 2007. Production and Processing of Medicinal Plants. Astan Ghods Razavi Publication, Mashhad.
25. Perez-Alonso, N., D. Wilken, A. Gerth, A. Jahn, H. Nitzsche, G. Kerns, A. Cappote-Perezand and E. Jimenez. 2009. Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. *Journal of Plant Physiology* 99: 151–156.
26. Perez-Bermudez, P., M. J. Cornejo and J. Segura. 1985. A morphogenetic role for ethylene in hypocotyl cultures of

Digitalis obscura L. *Plant Cell Reports* 4: 188–190.
27. Roca-Pe´rez, L., R. Boluda, I. Gavidia and P. Pe´rez-Bermu´dez. 2004. Seasonal cardenolide production and Dop5br gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. *Phytochemistry* 65: 1869–187.
28. Sales, E., J. Segura and I. Arrillaga. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of the cardenolide-producing plant *Digitalis minor* L. *Planta Medica* 69: 143–147.
29. Seyed Tabatabaei, B. E. and M. Omidi. 2011. Plant Cell and Tissue Culture. University of Tehran Press, Tehran.
30. Talebi, M., F. Eatesam and B. E. Seyed Tabatabaei. 2011. Use of node explants and Different Plant Growth Regulator Compounds in Direct Regeneration of Periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture* 10: 55-64.
31. Vela, S., I. Gavidia, P. Perez-Bermudez and J. Segura. 1991. Micropropagation of juvenile and adult *Digitalis obscura* and cardenolide content of clonally propagated plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 27: 143–146.
32. Yeh, J., W. Hunag, S. Kan and P. Wang. 2001. Inhibitory effects of *Digitalis* on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. *The Journal of Urology* 166: 1937–1942.

Journal of Crop Production and Processing
Vol. 8, No. 3, Fall 2018, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

Direct and Indirect *in vitro* Regeneration of Plantlets of *Digitalis lanata* and *D. purpurea* Species

M. Taghiei[1], M. Talebi[*2] and B. Sayed-Tabatabaei[3]

(Received: December 25-2015; Accepted: January 27-2018)

Abstract

Foxglove (*Digitalis* sp.), as an ornamental and medicinal plant, is used for treatment of heart congestive disorders. Use of plant cell and tissue culture can be effective in large scale micropropagation and stable production of medicinal compounds. In this study direct and indirect regeneration methods in two species of this genus (*D. purpurea* and *D. lanata*) were investigated in response to different concentrations of auxin and cytokinin. In indirect method (regeneration through callus), regeneration occurred only in *D. lanata* in response to 3mg L^{-1} BAP, and no regeneration observed in callus of *D. purpurea.* Use of 13 different combinations of plant growth regulators for direct regeneration from node explants showed that the best regeneration in both species occurred in MS medium supplemented by BAP. Number of shoots produced in direct method in *D. purpurea* was more than that of *D. lanata*. The response of explants of *D. lanata* to different treatments was faster. The results showed that phenol production in node culture of both species was much less than leaf culture in indirect regeneration. Rooting was rapidly achieved even in mediums without auxins and 1 mg L^{-1} Zeatin. Rooted plantlets transported into the soil and acclimated in greenhouse. Taking to the account of low phenol production and high number of shoots in direct regeneration, this method could be suggested for the micropropagation of foxglove.

Keywords: Foxglove, Regeneration, Tissue culture, Plant growth regulators

1, 2, 3. Graduated MSc. Student, Associate Professor and Professor, Respectively, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
*: Corresponding Author, Email: mtalebi@cc.iut.ac.ir