دراسة تأثير البوادئ الكولسترول والبروجستيرون تحت ظرف الظلام في إنتاج الكلايكوسيدات القلبية من نبات زهرة الكشتبان *Digitalis purpurea* L. في الزراعة النسيجية

إقبال حسن الخطيب

فرع العقاقير والنباتات الطبية – كلية الصيدلة – جامعة بغداد

المستخلص

أجريت هذه التجربة باستعمال تقنية زراعة الانسجة النباتية ، تم فيها استئصال أطراف الأفرع (Shoot tips) بطول 1 سم من البادرات المعقمة لنبات *Digitalis purpurea* L. صنف (Excelsior Mixed) وزراعتها على الوسط الغذائي MS مضافاً اليه مادة شبيه السايتوكاينين (TDZ) بتركيز 0.5 ملغم/لتر لغرض تحفيز عملية التضاعف الخضري مع اضافة البادئين البروجستيرون (Pro) والكولسترول (Cho) بالتراكيز 0.0 و0.1 و0.5 و1.0 و2.0 ملغم/لتر. نقلت الدوارق المزروعة الى غرفة النمو ، ونُميت تحت ظرف الظلام الكامل عند درجة حرارة 25 ± 2مْ. بعد 45 يوماً من بدء الزراعة اظهرت النتائج ان المعاملة المحتوية على مادة البروجستيرون بتركيز 2 ملغم/لتر كانت الأفضل من بقية المعاملات ولجميع الصفات المدروسة. اعطت الافرع المتضاعفة في هذه المعاملة حاصلاً جافاً بلغ 1.10 غم محتوياً على الكلايكوسيدات القلبية gitoxin, digitoxin و digoxin بكميات 0.24 و0.12 و0.13 مايكروغم/غم مادة جافة بالتتابع. كذلك أعطت هذه المعاملة معدلات عالية للصفات الاخرى وهي النسبة المئوية للسكريات الذائبة والنشا والتي بلغت 1.25% و1.89% بالتتابع.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences, 37(1) : 83 - 88, 2006 Al-Khateeb

EFFECT OF PRECURSORS, PROGESTERONE AND CHOLSTEROL UNDER DARK CONDITION ON PRODUCTION OF CARDIAC GLYCOSIDES FROM *DIGITALIS PURPUREA* L. VIA TISSUE CULTURE

I. H. Al-Khateeb
Department of Pharmcognosy and Medical Plants
College of Pharmacy - University of Baghdad

ABSTRACT

The present experiment was performed using the tissue culture technique. Shoot tips were taken from sterilized seedlings of *Digitalis purpurea.* (cv. Excelsior Mixed) 1 cm length then cultured on MS medium adding the semi-cytokinin TDZ with 0.5 mg\l concentration for induction multiplication shoot tips process with the addition of two kinds of precursores (progesterone and cholesterol) with the concentrations 0.0, 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/l .Explants were incubated in the growth room under complete darkness (for 24 hours/day) at 25 ± 2 C.

Results showed that incubation for 45 days of starting the culture, the treatment which contained progesterone precursor at concentration 2 mg\l was the best as compared to other treatments in respect to characteristics studied. In this treatment, the multiplicated shoots gave dry weight of 1.10 g containing cardiac glycosides digitoxin, gitoxin, digoxin with the amount of 0.13,0.12 and 0.24 mg/g dry weight, respectively. Beside the increases in dry weight and cardiac glycosides, other characteristics component of the shoots were increased as the containing precent ratio of soluble sugars and starch 1.25% and 1.89%, respectively.

المقدمة

نبات زهرة الكشتبان الارجوانية (*Digitlais purpurea* L.) هو احد النباتات التي تنتمي إلى عائلة حنك السبع Scrophulariaceae (29)، ويعد من بين النباتات الطبية المهمة لاستخدامه في علاج بعض امراض القلب المهمة خاصة مرض عجز القلب الاحتقاني Congestive heart failure (5). تستخدم أوراقه المجففة لهذا الغرض لكونها غنية بالكلايكوسيدات القلبية مثل digitoxin و gitoxin (28). تستخدم هذه الاوراق بعد تجفيفها اما بصورة عقار خام او تستخلص منها الكلايكوسيدات القلبية المطلوبة وتحضر على هيئة مادة دوائية (26)، ولكون هذه المركبات مهمة جدا في مجال الطب والصيدلة

•تاريخ استلام البحث 2005/4/22 ، تاريخ قبول البحث 2006/1/28
الكلمات المفتاحية : MS (Skoog Murashige) ، TDZ(Thidiazuron)، Pro(Progesterone)، Cho(Cholesterol).
Key Words: MS (Murashige and Skoog Medium) , TDZ (Thidiazuron), Pro (Progesteron), Cho (Cholesterol).

إضافة الى عدم امكانية تحضيرها بطريقة كيميائية او مايكروبايولوجية وعلى نطاق تجاري ، لذلك يبقى الانتاج الزراعي هو الطريقة الوحيدة للحصول عليها(9). من أجل ذلك اجريت أبحاث عديدة على هذا النبات من خلال الزراعة التقليدية او زراعة الأنسجة النباتية لأحداث زيادة في المحتوى الفعال لهذا النبات من الكلايكوسيدات القلبية.

في هذا البحث تم اختيار زراعة الانسجة النباتية لكون ان نبات زهرة الكشتبان هو احد النباتات التي يمكن الحصول على مركباتها الطبية عن طريق استخدام هذه التقنية وعلى نطاق تجاري (10)، وذلك من خلال نمو وتشكل اجزاء نباتية مختلفة مثل الافرع الخضرية المتضاعفة (8). هذا ونظراً لوجود عوامل عديدة في مجال زراعة الانسجة تؤثر في انتاج المركبات الفعالة مثل عامل الضوء ومكونات الوسط الغذائي الخاص بنمو وتشكل الاجزاء النباتية المسؤولة عن تصنيع وخزن هذه المركبات لذلك كان الهدف دراسة إمكانية الاستغناء عن دور عامل الضوء (أي وجود عامل الظلام) في محتوى الافرع المتضاعفة من الكلايكوسيدات القلبية المذكورة آنفاً وامكانية تعويض دوره باضافة بوادئ لتكوين هذه الكلايكوسيدات الى الوسط الغذائي الخاص بعملية تضاعف الافرع وهما البروجستيرون (Pro) والكولسترول (Cho).

المواد وطرائق العمل

الزراعة النسيجية للنبات

إنشاء المزرعة النسيجية : تم ذلك بتحضير وسط معقم لزراعة البذور تألف فقط من ماء مقطر وآكار(4) . تم استخدام آكار من نوع Difco–bacto–agar بمقدار 6 غم/لتر أضيف الى الماء المقطر ثم سخنت حتى الغليان باستخدام جهاز magnetic stirrer hot plate . بعد ذلك تم توزيع الوسط في أنابيب زجاجية بمقدار10 مل لكل أنبوبة. غطيت بأغطية خاصة وعقمت في جهاز الموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121 °م وضغط 1.04 كغم/سم^2 لمدة 20 دقيقة. بعد إخراجها رتبت بصورة مائلة وتركت لتبرد لحين زراعتها. بعد ذلك تمت عملية تعقيم بذور نبات زهرة الكشتبان الأرجوانية صنف Excelsior Mixed باستخدام الكحول الأثيلي تركيز 70% لمدة 30 ثانية (20)، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لمدة دقيقة لكل مرة ثم زرعت البذور بتوزيعها على سطح الوسط المعد لها (أجريت جميع هذه العمليات في كابينة الهواء المعقمة Laminar air flow cabinet) ثم نقلت إلى غرفة النمو تحت ظروف بيئية مسيطر عليها بدرجة حرارة 25 ± 2 °م وإضاءة لمدة 16 ساعة يومياً وبشدة مقدارها 40 – 60مايكرو انيشتاين/م^2/ثانية(14) وبعد مرور14 يوماً من بدء الزراعة تكونت بادرات جاهزة لاستئصال أطراف أفرعها.

تحضير الوسط الغذائي MS(24) : تم ذلك بتهيئة محاليل الأصل لهذا الوسط ثم دمج هذه المحاليل بالحجوم المطلوبة (جدول 1) ، ثم أكمل الحجم المطلوب بالماء المقطر مع اضافة الـTDZ بتركيز 0.5 ملغم/لتر والبادئان Pro وcho بالتراكيز 0.0 و2.0 و1.0 و0.5 و0.1 ملغم/لتر. بعد ذلك تم تعديل قيمة الدالة الهيدروجينية (pH) للتراكيز المذكورة إلى 5.5 (3) باستخدام محلول أحادي العيارية من هيدروكسيد الصوديوم أو حامض الهيدروكلوريك ، ثم أضيف الآكار من نوع Difco–bacto–agar بمقدار8 غم/لتر، ثم أكملت عملية إذابة الآكار والتعقيم كما مر آنفاً. كان الوسط الغذائي قد تم توزيعه في دوارق سعة 250 مل بمقدار 50 مل لكل دورق ، وبعد تبريدها زرعت بأطراف الأفرع بطول 1سم وبواقع طرف فرع واحد لكل دورق ثم حضنت الزرعات في غرفة النمو تحت ظرف الظلام بدرجة حرارة 25±2°م لمدة 45 يوماً.

تهيئة المادة النباتية للتحليل الكيميائي

بعد الانتهاء من مدة الحضن المذكورة تم إخراج الافرع المتضاعفة من أوعية الزراعة ودرست صفات عدد الافرع المتضاعفة ومحتوى الكلوروفيل الكلي للافرع المتضاعفة وتم تقدير صبغة الكلوروفيل (16).

الوزن الجاف : تم إخراج الافرع المتضاعفة من أوعية الزراعة باستخدام الملقط ، ثم غسلت بالماء الجاري للتخلص من بقايا الآكار الملتصق بها ومسحت بقطعة قماش نظيفة للتخلص من ماء الغسل. أجري بعد ذلك تفريق العينات النباتية ونشرت فوق ورق ترشيح وجففت في فرن التجفيف على درجة حرارة 40 °م لحين ثبات الوزن، ثم طحنت العينات على هيئة مسحوق خشن ووضعت في أكياس ورقية حرارية ورتبت فوق جسر مشبك موجود في حاوية زجاجية محكمة الغلق تحتوي في أسفلها على مادة كلوريك الكالسيوم ، ثم وضعت الحاوية في مكان مظلم(7).

النسبة المئوية للسكريات الذائبة والنشاء : تم تقديرها في العينات النباتية بحسب الطريقة (19).

استخلاص وتنقية الكلايكوسيدات القلبية : تم استخلاصها وتنقيتها باتباع طريقة Fujii وآخرون(11).

التقدير الكمي والنوعي للكلايكوسيدات القلبية المدروسة : تم عن طريق استخدام جهاز

كروماتوكرافيا السائل ذي الأداء العالي (HPLC) وباتباع طريقة Braga وآخرون(6).

جمعت البيانات الخاصة بالصفات المذكورة أعلاه. رتبت في جداول مناسبة وحللت احصائياً باستخدام التصميم العشوائي الكامل كتجربة عاملية بواقع عشرة مكررات لكل معاملة(1).

جدول 1. المكونات اللاعضوية والعضوية للوسط الغذائيMS

المكونات	ملغم /لتر
$MgSO_4.7H_2O$	370
$CaCl_2.2H_2O$	440
KNO_3	1900
NH_4NO_3	1650
KH_2PO_4	170
$FeSO_4.7H_2O$	27.85
Na_2EDTA	37.25
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.4H_2O$	8.6
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
CoCl2.6H2O	0.025
KL	0.83
H_3BO_4	6.2
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
Inositol	100
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine - HCL	0.5
Thiamine - HCL	0.1
Glycine	2
Sucrose	30000

النتائج والمناقشة

تضاعف الأفرع

من المعروف بان عملية تكوين وخزن الكلايكوسيدات القلبية لنبات زهرة اكشتبان تتم في الأوراق ، لذلك فانه في مجال زراعة الانسجة ستكون الافرع الخضرية المتضاعفة هي المصدر الرئيسي للحصول على هذه المركبات بصورة تجارية باعتبارها ممثلة للاوراق (9). كذلك فان تكوين الاوراق يحتاج الى الضوء كأحد العوامل المهمة لتكوينها فضلاً عن ضرورة وجود عامل غذائي ونظام انزيمي (2)، لذلك تم في هذه التجربة تحفيز عملية تضاعف الافرع على الرغم من وجود عامل الظلام طيلة المدة المحددة للعمل وذلك عن طريق إضافة مادة شبيه السايتوكاينين TDZ الى الوسط الغذائي وبتركيز 0.5 ملغم/لتر(3) (جدول 2). ان مادة TDZ هي مادة منظمة للنمو معروفة بقوتها في تحفيز عملية تضاعف الافرع ضمن تراكيز قليلة مقارنة بالسايتوكاينينات الادينينية الاخرى التي تستخدم عادة لهذا الغرض مثل البنزل ادينين (BA) والكاينيتين والذي اشار اليه عدد من الباحثين منهم Hucttenan وJohn(18).

ان مثل هذه النتيجة التي تم الحصول عليها في دراستنا (تكوين الافرع وتضاعفها)على الرغم من وجود عامل الظلام وعن طريق إضافات خارجية للوسط الغذائي وجدت في نتائج سابقة مثال التي أجراها Stuhlemmer وآخرون (27)، الا ان هنالك عدداً من الملاحظات ظهرت من ها البحث هي حدوث زيادة قليلة جداً في عدد الافرع المتضاعفة لبعض التراكيز المستخدمة للبادئين Pro و Cho مقارنة مع معاملة القياس وكانت غير معنوية . كما ظهر صغر في حجم الاوراق المتكونة للافرع المتضاعفة في جميع المعاملات وقلة في سمكها وتلونها باللون الابيض . ربما يعود ذلك الى انعدام وجود الضوء الذي يؤدي الى بعض الانعكاسات السلبية ومنها عدم تكون البلاستيدات الخضراء لانعدام الكلوروفيل ، وقلة في امكانية الاستفادة من بعض مكونات الوسط الغذائي من قبل الاجزاء النباتية المزروعة ، وضعف في فعالية بعض الأنزيمات داخل الأجزاء النباتية المزروعة(27).

جدول 2. تأثير إضافة البادئين Cho وPro مع وجود TDZ وتحت ظرف الظلام الكامل على عدد الأفرع المتضاعفة لنبات زهرة الكشتبان

التركيز ملغم/لتر	عدد الأفرع المتضاعفة	
	البادئان	
	Cho	Pro
0.0	14.10	14.10
0.1	14.10	14.11
0.5	14.13	14.10
1.0	14.15	14.16
2.0	14.15	14.10
L.S.D5%	غ.م	

تكوين الكلايكوسيدات القلبية

تم في هذا البحث إضافة البادئين البروجستيرون والكولسترول الى الوسط الغذائي MS، وكما هو معروف بان هاتين المادتين هما من البوادىء الداخلة في تكوين الكلايكوسيدات القلبية أي من المواد الداخلة في خطوات تكوين هذه المركبات (23)، لذلك تمت اضافتهما الى الوسط الغذائي لغرض رفع مستواهما داخل أنسجة الأجزاء النباتية المزروعة وهذا سيكون له انعكاس ايجابي على الكميات المتكونة من الكلايكوسيدات المدروسة (جدول 3). يلاحظ ان اغلب التراكيز المستخدمة للبادئين Pro وCho ادت الى احداث زيادة معنوية في كميات الكلايكوسيدات المدروسة مقارنة مع معاملة القياس. بشكل عام البادىء Pro خاصة بالتركيز 2 ملغم/لتر كان اكثر تأثيراً من Cho في احداث الزيادة المعنوية وسبب ذلك قد يعود الى ان Pro هو من البوادىء القريبة لتكوين هذه المركبات مقارنة مع Cho(15)، وبذلك فأن وجود Pro في الوسط الغذائي وامتصاصه من قبل الاجزاء النباتية المزروعة سيعجل من تحوله الى الكلايكوسيدات قيد البحث بصورة اكثر من Cho وهذا ما أوضحه بعض الباحثين على هذا النبات ومنهم Hagimori وآخرون (17) وMorales وآخرون (23). إذن، يمكن الاستفادة من هذين البادئين بتحولهما الى مركبات ذات فعالية طبية مهمة خاصة في حالة وجود نقص في احد العوامل المهمة لتكوين هذه المركبات كانعدام الضوء (22)، والذي سيؤدي بدوره الى حدوث انخفاض في عمليتي النمو والتشكل المختلفة مثل انخفاض سير العمليات الايضية المختلفة وتكوين وخزن الكلايكوسيدات.

جدول 3. تأثير إضافة البادئان Cho وPro مع TDZ تحت ظرف الظلام على محتوى الأفرع المتضاعفة لنبات زهرة الكشتبان من الكلايكوسيدات القلبية المدروسة

التركيز ملغم/لتر	الكلايكوسيدات القلبية (مايكرو غرام /غم وزن جاف)					
	Digitoxin		Gitoxin		Digoxin	
	البادئان		البادئان		البادئان	
	Cho	Pro	Cho	Pro	Cho	Pro
0.0	0.14	0.14	0.07	0.07	0.03	0.03
0.1	0.14	0.15	0.07	0.07	0.04	0.06
0.5	0.16	0.19	0.07	0.09	003	0.07
1.0	0.16	0.19	0.07	0.09	0.05	0.11
20	0.13	0.24	0.07	0.12	0.04	0.13
L.S.D5%	0.04		0.04		0.03	

تكوين الكلوروفيل والنشا والسكريات الذائبة

درست هذه الصفات بسبب ما أشار اليه بعض الباحثين (21) بانها من بين اكثر الصفات التي تبدي تغايراً مع التغاير الذي يحدث في الكميات المتكونة في الكلايكوسيدات القلبية وبينوا ان هذه الصفات في بعض الاحيان قد تربطها علاقة ايجابية مع الكميات المتكونة من هذه الكلايكوسيدات . فالذي لوحظ في نتائج جدول 4 هو ان المحتوى الكلي للكلوروفيل كانت قيمته صفراً لجميع المعاملات المدروسة ، وهذا امر طبيعي يعود الى عدم وجود الضوء وبالتالي حدوث انخفاض في تمايز بعض مكونات الخلية كالبلاستيدات الخضراء المسؤولة عن تكوين صبغة الكلورفيل والحاملة لبعض الانزيمات المسؤولة عن تكوين وخزن الكلايكوسيدات القلبية (9 ، 12)، الا ان ذلك لايعني ان انخفاض مستوى تمايز البلاستيدات الخضراء معناه حدوث انعدام في تكوين المركبات العلاجية وذلك لكون ان

اكتمال تمايز البلاستيدات الخضراء هو ليس العامل الوحيد والمحدد لتكوين هذه المركبات ، وانما هنالك مكونات اخرى يجب ان يكتمل تمايزها كالمايتوكوندريا والفجوات والشبكة الاندوبلازمية والاوراق حتى يكتمل تكوين هذه المركبات (23). يمكن تعويض دور الضوء في تمايز هذه المكونات ولو بمقدار قليل عن طريق اضافات خارجية مختلفة الى الوسط الغذائي كمنظمات النمو او رفع مستوى السكريات او البوادىء لتكوين هذه المركبات داخل أنسجة الأجزاء النباتية المزروعة(27).

أما بالنسبة للسكريات الذائبة والنشا فقد لوحظ ايضا من نتائج جدول 4 بانهما تكونا في جميع المعاملات المدروسة ابتداءا من معاملة القياس ، وبوجود البادئين Pro وCho في الوسط الغذائي فأدى ذلك إلى احداث زيادة معنوية في تكونهما خاصة عند التراكيز 2 ملغم/لتر من Pro حيث بلغت قيمتهما بالتتابع 1.25% و1.89%. ربما يعود السبب في ذلك الى دور TDZ في تكوين السكريات الذائبة والنشاء (30) ودور وجود البادئين ، فربما ان مقدار التحلل الذي حدث فيهما ساعد على احداث زيادة في النسبة المئوية للسكريات الذائبة والنشا واللذين بدورهما سيكونان مصدرا للطاقة والكاربون الضروريين لتكوين الهيكل الكاربوني الكبير للكلايكوسيدات (31). لذلك لوحظ وكما ذكر بان التركيز العالي من Pro وهو 2 ملغم/لتر قد اعطى اعلى القيم لكميات الكلايكوسيدات مقارنة بالتراكيز الاخرى ، وقد وجدت مثل هذه النتيجة في نتائج Hagimori وآخرون(17).

الوزن الجاف

درس الوزن الجاف للأفرع المتضاعفة باعتبار ان المادة الجافة هي التي ستكون مصدرا للكلايكوسيدات القلبية المطلوبة (25). لذلك كان من الضروري التعرف على المعاملة التي أعطت أعلى مادة جافة ، وكما هو واضح في نتائج جدول 4 فإن المعاملة المحتوية على 2 ملغم/لتر من Pro هي التي اعطت اعلى معدل للمادة الجافة وربما يعود السبب في ذلك الى ارتفاع محتوى الافرع المتضاعفة لهذه المعاملة من المنتجات الايضية(13).

جدول 4. تأثير إضافة البادئين Cho, Pro مع TDZ تحت ظرف الظلام على محتوى الكلوروفيل الكلي والنسبة المئوية للسكريات الذائبة والنشا والوزن الجاف الكلي للأفرع المتضاعفة لنبات زهرة الكشتبان*

التركيز ملغم/لتر	السكريات الذائبة(%)	
	البادئان	
	Cho	Pro
0.0	1.00	1.00
0.1	1.02	1.01
0.5	1.00	1.23
1.0	1.14	1.21
2.0	1.17	1.25
L.S.D.5%	0.06	

التركيز ملغم/لتر	النشا (%)		الوزن الجاف (غم)	
	البادئان		البادئان	
	Cho	Pro	Cho	Pro
0.0	1.52	1.52	0.82	0.81
0.1	1.59	1.59	0.82	0.83
0.5	1.51	1.76	0.81	0.81
1.0	1.65	1.70	0.84	0.84
2.0	1.74	1.89	0.86	1.10
L.S.D.5%	0.10		0.11	

* قيم الكلوروفيل الكلي لكلا البادئين كان صفرا .

المصادر

1-الراوي ، خاشع محمود وعبد العزيزخلف الله.1980. تصميم وتحليل التجارب الزراعية . جامعة الموصل . كلية الزراعة والغابات. العراق.

2-إيدلمان ، م و بلاك.و.ج. 1980. نمو النبات (مترجم). جامعة الموصل . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق.

3-عواد ، زينب جليل . 2004.تأثير املاح وpH الوسط الغذائي MS على المحتوى الكلايكوسيدي القلبي لنبات زهرة الكشتبان الارجوانية *Digitalis purpurea* في الزراعة النسيجية. مجلة العلوم الزراعية العراقية. (35)6: 73-82.

4-Arrillaga, I., M. C. Brisa and J. Segura. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl culture of

woody plant tissure. Plant Cell Tissue and Organ Culture 33:105-119.
19-Joslyn, M. A. 1970. Methods in Food Analysis, Physical, Chemical, Chemical and Instrumental Methods of Analysis. 2nd Academic Press, New York and London.
20-Kubalakova, M., I. Spitzova and F. J. Novak. 1987. Stability of lanatoside C content in the *in vitro* propagated *Digitalis lanata* clones. Biologia Plantarum (PRAHA). 29 (1):7-9.
21-Kubrski, C., H. Scheibner, C. Steup, B. Diettrich and M. Luckner. 1984. Embryogensis and cardenolide formation in tissue culture of *Digitalis lanata*. Phytochemistry 23(7):1407-1412.
22-Milek, F., E. Reinhard and W. Kreis. 1997. Influence of precursors and inhibitors of the sterol pathway on sterol and cardenolide metabolism in *Digitalis lanata* EHRH. Plant Physiol .Biochem 35(2): 111-121.
23-Morales, C., R. Cusido, J. Palazon, M. Bonfill and M. T. Pinol. 1999. Digitals plants and tissue cultures, improved condition for cardenolide production. Plant Biology.
24-Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15: 473-497.
25-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 Physiol. 36(2) : 247-252.
26-Seigler, D. S. 1998. Plant Secondray Metabolism.. The Plant Tissue Culture Book Store. Kluwer Academic, Boston. USA.
27-Stuhlemmer, U., W. Kreis, M. Eisenbeiss and E. Reinhard. 1993. Cardiac glycosides in partly submerged shoot of *Digitalis lanata*. Planta Medica. 59 : 539-545.
28-Theurer, C., W. Kreis and E. Reinhard. 1998. Effcts of digitoxigenin, digoxigenin and various cardiac glycosides on cardenolide accumulation in shoot cultures of *Digitalis lanata*. Planta Medica. 64 : 705 – 710.
29-Tyler, V. E. 1994. Basic Principles. Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytomedicinals. Pharmaceutical Products Press. New York. USA.
30-Wang, S. Y., M. Faust, M. J. Line. 1996. Apical dominance in apple (*Malus domestica*): The possiple role of indole – 3-acetic acid. Amer. Soc. Hort. Sci. (USA). 119:1215-1221 (ABS).
31-Wurtele, E. S. and G. Keller. 1986. Carbohydrate metabolism and strach accumulation during somatic embryognesis of *Digitalis lanata*. Plant Tissue and Cell Culture 58:

Digitalis obscular. J. Plant Physiol. 124:425-430.
5-Bradford and Keighlry. 2000.GUCH–Cardiac Glycosides–Digitalis. http://www.users.globalnet.Co.UK/aghorner/guch/htm//digo.
6-Braga, F. C., W. Kreis. and A. B. Deoliveira. 1998. Effect of *Digitalis lanata* matrix composition on the lanatoside C partition coefficient and its consequence on rotation locular counter current chromatography efficiency. J. of Chromato. 822:37-44.
7-Brugidou, C., M. Jacques, L. Cosson, F. X. Jarreau and T. Ogerau. 1988. Growth and digoxin content in *Digitalis lanata* in controlled condition and natural environment. Planta Medica. 54:262-265.
8-Diettrich, B., H. Mertina and M. Luckner. 1990. Formation of *Digitalis lanata* clone lines by shoot tip culture. Planta Medica 56:53-56.
9-Eisenbeib, M., W. Kreis and E. Reinhard. 1999. Cardenolide biosynthesis in light and dark grown *Digitalis lanata* shoot cultures. Plant Physiol. Biochem. (37)1: 13-23.
10-Fowler, M. W. 1980. New approaches to plants as sources of medicinal compounds. The Pharmaceutical J. 12:39-40.
11-Fujii, Y., Y. Ikeda and M. Yamazake. 1990. Quantitative determination of Digitalis glycosides in *Digitalis purpurea* leaves by reversed -phase thin- layer chromato. J. of Liquid Chromatography. 13 : 1909-1919.
12-Fuller, K. W. 1984. Chemicals from plant cell cultures - some biochemical and physiological pointers. Chemistry and Industry: 325-333.
13-Gartner, D. E. and H. U. Sitz. 1993. Enzyme activities in cardenolides - accumulating, mixotrophic shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. J. Plant Physiol. 141: 269- 275.
14-Gartner, D. E., W. Keilholz and H. U. Seitz. 1994. Purification, characterization and partial peptide microsequencing of progesterone 5 B-reductase from shoot cultures of *Digitalis purpurea*. Eur. J. Biochem. 225: 1125- 1135.
15-Golz, A. and H. K. Lichtenthaler. 1993. Isolation and characterization of acetyl-CoA synthetase from etiolated radish seedling. J. Plant Physiol. 141:276-280.
16-Goodwing, T. W. 1976. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. 2nd ed. Academic Press, London, New York, Sanfrancisco.
17-Hagimori, M., T. Matsumoto and Y. Obi. 1982. Effects of cultural condition on digitoxin formation by shoot-forming culturesof *Digitalis purpurea* grown in liquid mediaproc, 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. 349- 350.
18-Huctteman, C. A. and E. P. John. 1993. Thidiazuroni a potent cytokinin for