نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۵، شماره ۳، صفحه ۴۵۵-۴۳۷ (۱۳۹۸)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2019.122953.2377
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.35.437.95.3.1576.32

بررسی اثر نوع محیط‌های کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات رشدی، ترکیب‌های بیوشیمیایی و مواد مؤثره ترخون (*Artemisia dracuunculus* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

یاسمن شکوری[1] و بهاره کاشفی[2*]

۱- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد، گروه کشاورزی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه کشاورزی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

پست الکترونیک: bahareh.kashefi@gmail.com

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۷ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۸

چکیده

با توجه به اهمیت گیاه ترخون (*Artemisia dracuunculus* L.) از نظر دارویی و مشکلات موجود برای تکثیر آن می‌توان از تکنیک کشت بافت برای ازدیاد آن استفاده نمود. هدف از اجرای این مطالعه مقایسه محیط کشت‌های متفاوت و محرک‌های شیمیایی بر صفات رشدی و ترکیب‌های بیوشیمیایی ترخون بود. تیمارهای آزمایش شامل محیط کشت‌های موراشیگ و اسکوگ (MS)، گامبورگ (B5) و شنک و هیلدبرانک (SH) و همچنین تنظیم‌کننده‌های رشد کینتین، NAA، 2,4-D به تنهایی و ترکیب NAA + کینتین و ترکیب 2,4-D + کینتین با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بودند. این تحقیق به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تیمارهای محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد اثر معنی‌داری بر خصوصیات کالوس، گیاهچه باززایی شده، ترکیب‌های بیوشیمیایی کالوس، اسانس گیاه و ترکیب‌های آن داشت. محیط کشت MS سبب شد درصد بالاتر کالزایی و وزن تر و خشک آن به میزان بیشتری افزایش یابد. بیشترین درصد باززایی (۳۵/۵٪)، طول ریشه (۱/۲۸ سانتی‌متر)، وزن خشک ریشه (۶/۵ گرم) و وزن خشک ساقه (۲/۶ گرم) در محیط کشت MS، NAA+ کینتین و 2,4-D+ کینتین حاصل شد. همچنین میزان فلاونوئید، میزان فنول و ترکیب‌های فنولی در کالوس ترخون در محیط کشت MS، NAA+ کینتین و 2,4-D+ کینتین بالاتر بود. میزان اسانس (۲/۴۲٪) و اوسیمون (۵/۷۸٪) در محیط کشت MS، NAA+ کینتین و 2,4-D+ کینتین بیشتر از سایر تیمارها بود. همچنین درصد استراگول با کاربرد 2,4-D افزایش یافت و NAA سبب افزایش درصد اوسیمون، لیمونن و لینانول موجود در اسانس گردید. درصد لیمونن با کاربرد تنهای NAA و درصد لینانول در تیمار 2,4-D+ کینتین بیشتر از سایر تیمارها بود. نتایج نشان داد که بالاترین شاخص رشدی، ترکیب بیوشیمیایی و اسانس در محیط کشت پایه MS حاوی (تنظیم‌کننده‌های رشد) مشاهده شد. همچنین کاربرد کینتین به همراه NAA و 2,4-D سبب بهبود رشد کالوس، باززایی، اسانس و برخی ترکیب‌های موجود در اسانس ترخون گردید.

واژه‌های کلیدی: اسانس، اکسین، کالوس، کشت بافت، گیاه دارویی، سیتوکینین.

مقدمه

ترخون (*Artemisia dracuunculus* L.) از گیاهان دارویی پایا و علفی متعلق به خانواده Asteraecae بوده که دارای گل‌های سبز مایل به زردخوشه‌ای به همراه یک میوه فندقه است که بخش‌های هوایی آن به‌ویژه برگ و سرشاخه‌های گلدار تازه و یا خشک شده آن دارای خاصیت دارویی می‌باشند (Omidbeigi, 2010). گسترش اکولوژیکی گونه دارویی ترخون مربوط به کوهستان‌های سرد اروپا و آمریکا و مناطق مختلف روسیه و سیبری است و در ایران نیز در بیشتر نقاط کشور یافت می‌شود (Sayyah *et al.*, 2004). تغییرات اسانس در ترخون بیشتر در ماه‌های خرداد و تیر انجام می‌شود (Olszewska-Kaczynska & Suchorska, 1996). ترکیب‌های موجود در اسانس گیاهان به‌طور معمول از دو مسیر بیوشیمیایی ساخته می‌شوند. اولی مسیر بیوسنتزی ترپنوئیدها و دیگری مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئیدها می‌باشد، که هر دو مسیر در ارتباط با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌باشند (Chappell, 1995).

در کشت بافت می‌توان گونه‌های مختلف را خیلی سریع‌تر از روش‌های سنتی تکثیر کرد و کشت‌ها را با قسمت‌های کوچکی از گیاه آغاز کرد، بنابراین با فضای کم، تعداد زیادی گیاه تکثیر می‌گردد (VanStaden, 2008). از آنجا که تکثیر گیاه ترخون از طریق روش جنسی سخت بوده و بندرت انجام می‌شود و همچنین در تکثیر رویشی با پاجوش تعداد گیاهان تولیدی هر گیاه ناچیز است و از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد (Tatari *et al.*, 2010)؛ بنابراین کشت بافت در تکثیر این گیاه اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است. در تکنیک کشت بافت گیاهی از محیط‌های کشت متفاوت استفاده شده و از تنظیم‌کننده‌های رشدی مختلفی بهره می‌برند (Alizadeh, 2012).

تولید کالوس و درصد باززایی با توجه به گونه گیاه، شرایط محیط و ترکیب‌های تنظیم‌کننده رشدی متفاوت است (Tripathi & Tripathi, 2003). در گیاه *Tridax procumbens* بیشترین میزان القای کالوس و درصد باززایی در غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2-4-D حاصل گردید (Wani *et al.*, 2010). مشخص شد که بالاترین درصد کال‌زایی و وزن کالوس در محیط کشت پایه MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D برای *angustifolia* تولید شد (Keikhaakhar *et al.*, 2013). در مطالعه انجام شده بر روی گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare*) مشخص شد که بهترین محیط کشت برای تشکیل و تکثیر کالوس، محیط کشت پایه MS حاوی 2,4-D با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد (Kumari & Saradhi, 1992). نتایج تحقیقات نشان داد که در کشت بافت گل انگشتانه (*Digitalis lanata*) محیط کشت MS نسبت به محیط کشت پایه گامبورگ (B5) درصد باززایی بیشتری داشت (Karimi *et al.*, 2015). در مطالعه‌ای دیگر بالاترین درصد کالوس در گیاه *Momordica charantia* به میزان ۹۳٪ در محیط کشت MS با یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D حاصل شد و ریزنمونه ریشه بالاترین درصد تولید کالوس (۸۵٪) را در محیط کشت پایه MS تکمیل شده با ۰/۶ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP تولید نمود (Munsur *et al.*, 2009). همچنین بالاترین وزن تر کالوس مربوط به تیمار یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در محیط پایه MS بود (Wu *et al.*, 1998).

عوامل مهمی که در کارایی روش باززایی نقش دارند نوع ریزنمونه، محیط کشت پایه، ترکیب تنظیم‌کننده‌های رشد و غلظت و نسبت آنها در کشت بافت می‌باشد. در گیاه *Digitalis lanata* باززایی موفق در ترکیب اکسین با سیتوکینین بدست آمد (Diettrich *et al.*, 1990). تحقیقات تأثیر مثبت کینتین بر روی تولید و افزایش طول ریشه را در گیاه شب‌بو (*Matthiola incana*) نمایان کرد (Kaviani *et al.*, 2014). به‌طوری که بیشترین طول ریشه و ساقه حاصل از کالوس *Gerbera aurantiaca* در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم کینتین بدست آمد (Tatari *et al.*, 2010).

مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی در تمام جنبه‌های چرخه حیاتی گیاه کاربرد دارد، به‌طوری که این مواد می‌توانند اثر عمیقی بر روی واکنش‌های گیاه و تولید متابولیت‌های ثانویه داشته باشند (Morzadec & Hourmant, 1997). از مهمترین ترکیب‌هایی که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند می‌توان به کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها و ترکیب‌های

فنلی اشاره نمود (Kiarostami & Mosafa, 2016). محیط کشت‌های مختلف و تنظیم‌کننده‌های رشد بر میزان این ترکیب‌ها اثر دارند. در گیاه *Saussurea medusa* بیشترین میزان مواد فلاونوئیدی در محیط کشت MS حاصل شد (Yen *et al*., 2010). کاربرد NAA در محیط کشت، توانایی بیوسنتزی کالوس را در گیاه چای افزایش داده و تجمع ترکیب‌های فنلی را مانند فلاونوئید تحریک نمود (Nikolaeva *et al*., 2009).

گیاه تازه ترخون دارای ۰/۱٪ تا ۰/۴٪ اسانس مرکب از ۶۰٪ تا ۷۰٪ استراگول، ۱۵٪ تا ۲۰٪ از سایر ترپن‌ها شامل اوسیمن، فلاندرن، پارامتوکسی سینامیک آلدهید، آرتمدینول، فلاونوئیدها شامل روتین و کورستین ۳-گلوکوگالاکتوزید است. به‌علاوه مقداری تانن نیز در این گیاه وجود دارد. اسانس ترخون مایعی سیال، محلول در روغن و غیرمحلول در گلیسرین به رنگ زرد و وزن مخصوص آن حدود ۰/۹۱ تا ۰/۹۵ می‌باشد (Omidbeigi, 2010). محیط‌های مختلف کشت نیز دارای اثرهای متفاوتی بر تولید این ترکیب‌های ثانویه هستند. تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و IAA سبب افزایش مونوترپن‌های اسانس ازجمله آلفا-پینن، لیمونن، سیس بتا-اوسیمن و ترانس بتا-اوسیمن در گیاه ترخون شد (El-Khateeb, 1994). تنظیم‌کننده‌های رشد IAA و NAA سبب افزایش بازده اسانس ترخون شده و کیفیت اسانس را در جهت افزایش درصد مونوترپنوئیدهای آن و کاهش درصد اصلی‌ترین ترکیب اسانس یعنی متیل کچاویکول تغییر داد (Pazoki *et al*., 2008). بیشترین میزان ماده مؤثره رزمارینیک اسید در محیط کشت MS در گونه *angustifolia* گزارش شد (Kiarostami & Mosafa, 2016). حداکثر تولید رزمارینیک اسید در کشت کالوس *Salvia fruticosa* در حضور ۲/۱۲ میلی‌گرم NAA در ۱۰۰ میلی‌گرم وزن خشک بود (Nabila *et al*., 2003). همچنین افزایش لیمونن و پینن در اسانس شوید تحت تأثیر IAA گزارش شده است (El-Khateeb, 1994). محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد با نقش تعیین‌کننده‌ای که در کشت بافت گیاهان مختلف دارند می‌توانند باززایی گیاهانی را که تکثیر آنها از طریق بذر مشکل است تسریع نموده، همچنین می‌توانند بر تولید ترکیب‌های مؤثره گیاهان دارویی مختلف اثرگذار باشند. از این‌رو هدف از اجرای این تحقیق بررسی اثر محیط‌های مختلف رشد و تنظیم‌کننده‌های رشدی بر تولید کالوس، باززایی و ترکیب‌های بیوشیمیایی و اسانس گیاه دارویی ترخون می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌منظور بررسی اثر محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف بر خصوصیات کالوس، باززایی، خصوصیات رشدی و ترکیب‌های بیوشیمیایی گیاه دارویی ترخون انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS)، محیط کشت گامبورگ (B5) و محیط کشت شنک و هیلدبرانک (SH) و تنظیم‌کننده‌های رشد کینتین، NAA، 2,4-D، ترکیب NAA + کینتین و ترکیب 2,4-D + کینتین به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بودند.

وسایل آزمایشگاهی در داخل اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر) ضدعفونی گردید. نمونه‌های گیاه کامل از مرکز گیاهان دارویی مؤسسه بذر و نهال کرج تهیه شد. به‌منظور سترون‌سازی ریزنمونه‌ها (جوانه‌های جانبی گیاه) در اتاقک کشت، قطعات گیاهی در الکل ۷۰٪ به مدت ۴۰ ثانیه قرار گرفته و پس از شستشو با آب‌مقطر به مدت ۱ دقیقه، در هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و در نهایت با آب‌مقطر سترون شستشو نهایی انجام شد. برای کشت دادن ریزنمونه‌ها از محیط کشت پایه MS دارای تنظیم‌کننده رشد بنزیل آدنین پورین با غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. پس از رشد، نمونه‌ها به محیط‌های MS حاوی غلظت‌های استاندارد موراشینگ و اسکوگ به اضافه ۱۵ گرم در لیتر ساکارز و ۳/۵ گرم آگار با اسیدیته ۵/۷ و محیط کشت SH و B5 انتقال داده شدند. پس از شش هفته از رشد کالوس تعداد ۵ نمونه کالوس از هر یک از تیمارها وزن شد و میانگین وزن تر آنها ثبت

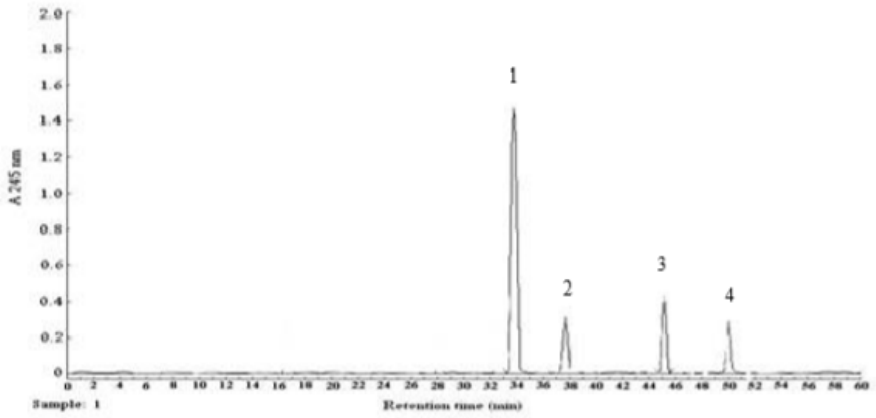
گردید و پس از ۷۲ ساعت قرارگیری در دمای ۷۰ درجه در آون وزن خشک آنها نیز ثبت شد (Tanoori *et al*., 2015). برای بررسی باززایی، کالوس‌های تازه (۶ هفته‌ای) به وزن ۰/۵ گرم در شیشه‌های ۲۰۰ میلی‌لیتری محتوای ۵۰ میلی‌لیتر محیط‌های کشت به همراه تنظیم‌کننده‌های رشد یادشده انتقال داده شدند و در اتاقک رشد با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت نور با شدت ۴۰۰۰ لوکس قرار داده شدند. کالوس‌ها به مدت ۴ هفته در همین شرایط رشد نمودند و پس از این مدت درصد گیاهان باززایی شده ثبت گردید. سپس گیاهچه‌های سالم جدا و طول و وزن خشک ریشه و ساقه اندازه‌گیری شد.

سنجش فلاونوئید با استفاده از کوئرستین به روش رنگ‌سنجی کلرید آمونیوم انجام شد (Chang *et al*., 2002). برای این کار مقدار ۰/۵ گرم نمونه کالوس در ۱۰ میلی‌لیتر عصاره متانول حل شد. نمونه در هاون چینی له گردید و بعد ۵۰ میلی‌متر متانول ۸۰٪ به آن اضافه و بر روی شیکر قرار گرفته تا خوب مخلوط گردد. پس از آن مخلوط‌های بدست‌آمده به مدت ۴ دقیقه با ۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره حاصل، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدآمونیوم ۱۰٪ و ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول استات پتاسیم یک مولار اضافه شد. در نهایت ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده و محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شده و پس از آن جذب مخلوط حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

برای اندازه‌گیری فنل کل از محلول گالیک اسید استفاده شد. در این روش مقدار فنول کل برابر با میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن تر بیان شد (Wu *et al*., 1998). ابتدا ۰/۱ گرم از نمونه تازه کالوس را در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ ساییده و به‌مدت ۷۲ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس به یک میلی‌لیتر از محلول رویی یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ اضافه شد و با آب‌مقطر دو بار تقطیر حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. آنگاه ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰٪ و یک میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵٪ به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری شد و بعد جذب هر نمونه در مقابل بلانک (متانول) در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد.

ترکیب‌های فنولی نیز با روش فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد (Asghari *et al*., 2015). برای این کار مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه را با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۷۰٪ به مدت ۲۴ ساعت خیس کرده و عصاره‌گیری شد. سپس به ۵۰ میکرولیتر از عصاره بدست‌آمده که حجم آن با آب‌مقطر به ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد، مقدار ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتیو یک نرمال و ۱/۲۵ میلی‌لیتر از محلول سدیم کربنات ۲۰٪ اضافه کرده و بعد از طی زمان ۴۰ دقیقه‌ای در تاریکی، جذب آنها در طول موج ۷۲۵ نانومتر در مقابل بلانک اندازه‌گیری شد.

استخراج اسانس به‌وسیله دستگاه کلونجر مدل laborota 4003، ساخت شرکت هیدولف آلمان انجام گردید. برای استخراج اسانس مقدار ۱۰ گرم نمونه خشک شده برگی را در بالن ۲۰۰۰ میلی‌لیتری ریخته و به آن حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده و عمل استخراج و اسانس‌گیری انجام شد. اسانس حاصل پس از جمع‌آوری در ظرف یادشده در یخچال نگهداری شد (Renata & Grażyna, 2014). برای اجرای HPLC مقدار ۵ میلی‌گرم از بافت هر نمونه در ۵ میلی‌لیتر از فاز متحرک که شامل متانول بود درون ظرف مدرج مخلوط شد و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید. قبل از فیلتر کردن نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرومتری به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. برای تهیه استوک اولیه ۵ میلی‌گرم از عصاره در ۵ میلی‌لیتر از فاز مایع مخلوط شد و استانداردسازی تا دامنه ۲۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌گرم انجام شد. برای تعیین ترکیب‌های اسانس با استفاده از HPLC یک نمونه ۲۰ میکرولیتری از عصاره استخراج شده به داخل ستون با مشخصات 5 (i.d) 4.6mm × 250µm ODS انتقال داده شد و کروماتوگرافی با شرایط بالا اجرا شد. در هر نمونه پیک بدست‌آمده براساس غلظت متناظر با آن بدست آمد و داده‌های مربوطه ثبت شدند (Amany *et al*., 2011) (شکل ۱).



شکل ۱- کروماتوگرام HPLC ترکیب‌های استاندارد: ۱) استراگول، ۲) اوسیمون، ۳) لیمونن و ۴) لینانول

در نهایت تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گردید. برای تهیه نمودار از برنامه Excel استفاده گردید.

نتایج

براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها مشخص شد که اثر تیمارهای محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد کال‌زایی، وزن تر کالوس، درصد باززایی، طول و وزن خشک ریشه و ساقه معنی‌دار شد. همچنین نتایج نشان داد اثر متقابل فقط بر وزن تر کالوس معنی‌دار شد و بر سایر صفات معنی‌دار نبود (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس خصوصیات کالوس و گیاهچه باززایی شده ترخون در محیط کشت‌های مختلف (MS، B5 و SH) با کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف (کینتین، NAA، 2,4-D، NAA + کینتین و 2,4-D + کینتین)

منابع تغییرات	درجه آزادی	کال‌زایی	وزن تر کالوس	درصد باززایی	طول ساقه	طول ریشه	وزن خشک ساقه	وزن خشک ریشه
تکرار	۳	۸۳/۹	۰/۰۵۷	۲۹۲	۰/۱۷	۰/۰۵۶	۱۳/۱۴	۲/۱۹
محیط کشت (a)	۲	۴۳۰**	۰/۶۸**	۴۲۳**	۲/۸**	۰/۴۸**	۲۹/۷**	۷/۶**
تنظیم‌کننده رشد (b)	۴	۲۰۹**	۰/۵۷**	۲۱۱**	۰/۶۵**	۰/۳۱**	۷/۷**	۳/۸**
a×b	۸	۴/۸۳ns	۰/۰۲۱**	۱۲/۳ns	۰/۰۱۱ns	۰/۰۱۷ns	۰/۱۲ns	۰/۲۹ns
خطا	۴۲	۷/۲۴	۰/۰۰۶	۱۶/۴	۰/۰۱۶	۰/۰۰۸۲	۰/۴۹	۰/۱۴
ضریب تغییرات (٪)		۳/۲	۴/۳	۱۲/۷	۸/۷	۸/۰۳	۱۳/۱	۱۲/۲

ns و**: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

درصد کال‌زایی

براساس نتایج حاصل از این تحقیق مشخص شد که بالاترین درصد کال‌زایی (۸۸٪) در تیمار محیط کشت MS و کمترین میزان آن (۷۸٪) نیز در محیط کشت B5 بدست آمد (جدول ۲). تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف اثرهای متفاوتی بر درصد کال‌زایی داشتند، به‌طوری که بیشترین درصد کال‌زایی

به میزان ۸۸٪ و ۸۵٪ به‌ترتیب در تیمارهای کاربرد NAA+ کینتین و 2,4-D+ کینتین حاصل شد. البته بین این دو تیمار و کاربرد NAA (۸۳٪) به تنهایی از این نظر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. به‌طوری که کمترین درصد کال‌زایی در بین تیمارهای مختلف مربوط به تیمار 2,4-D بود (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین خصوصیات کالوس و گیاهچه باززایی شده ترخون در محیط کشت‌های مختلف (MS، B5 و SH) با کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف (کینتین، NAA، 2,4-D، NAA + کینتین و 2,4-D + کینتین)

تیمارها	کال‌زایی (٪)	باززایی (٪)	طول ساقه (cm)	طول ریشه (cm)	وزن خشک ساقه (g)	وزن خشک ریشه (g)
محیط کشت						
موراشیگ و اسکوک (MS)	۸۸a	۳۵/۵a	۱/۸۷a	۱/۲۸a	۶/۵a	۲/۶a
شنک و هیلدبراک (SH)	۸۲b	۳۲/۹b	۱/۴۸b	۱/۱۲b	۵/۳b	۱/۹b
گامبورگ (B5)	۷۸c	۲۶/۵c	۱/۱۲c	۰/۹۷c	۴/۱c	۱/۳c
تنظیم‌کننده‌های رشد						
نفتالین استیک اسید (NAA)	۸۳ab	۳۱b	۱/۲۴c	۱/۱۶b	۵/۳b	۲b
کینتین (Kin)	۸۰b	۲۷c	۱/۴۲b	۱c	۴/۴c	۱/۵c
توفوردی (2,4-D)	۷۸b	۲۷c	۱/۲c	۱c	۴/۷bc	۱/۲c
NAA+Kin	۸۸a	۳۶/۹a	۱/۷a	۱/۳a	۶a	۲/۶a
2,4-D+Kin	۸۵ab	۳۴ab	۱/۷۳a	۱/۲۴a	۵/۹a	۲/۳a

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه می‌باشند تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

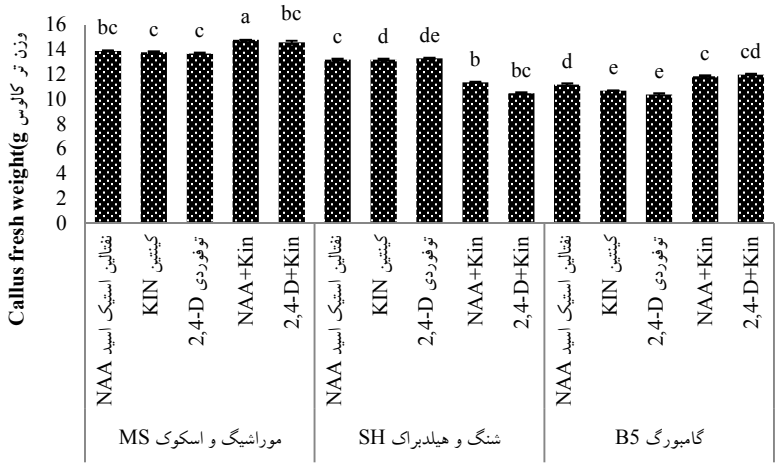
وزن تر کالوس

براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها مشخص شد که کاربرد توأم کینتین به همراه NAA و 2,4-D در محیط کشت MS نسبت به دو محیط کشت دیگر از نظر وزن تر کالوس دارای برتری بود، به‌طوری که در این محیط کشت بیشترین میزان وزن تر کالوس (۲/۳۹ گرم) در تیمار کاربرد توأم NAA + کینتین بود. کاربرد همه تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت گامبورگ نسبت به دو محیط کشت MS و SH اثر کمتری بر وزن تر کالوس داشت و کمترین میزان وزن تر کالوس در این محیط کشت متعلق به تیمار کاربرد تنهای 2,4-D بود (شکل ۲). با توجه به اینکه وزن تر کالوس در محیط کشت B5 نسبت به دو محیط دیگر کاهش یافت، ولی مشاهده شد که کاربرد توأم NAA+ کینتین نسبت به کاربرد تنهای سه تنظیم‌کننده رشد مورد مطالعه بیشتر بود.

درصد باززایی

درصد باززایی در محیط‌های کشت مختلف MS، SH و B5 به‌ترتیب ۳۵/۵٪، ۳۲/۹٪ و ۲۶/۵۵٪ بود که بیانگر برتری محیط کشت MS نسبت به سایر محیط‌ها در القای باززایی ترخون می‌باشد (جدول ۲). با توجه به اینکه بین دو تنظیم‌کننده رشد کینتین و 2,4-D از نظر آماری

اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، ولی درصد باززایی در این دو تیمار به‌طور معنی‌داری کمتر از کاربرد تنهای NAA بود. این در حالی بود که درصد باززایی در تیمار کاربرد توأم NAA+ کینتین (۳۶/۹٪) نسبت به تیمار 2,4-D+ کینتین (۳۴٪) برتری داشت (جدول ۲).



شکل ۲- اثر متقابل تیمارهای مختلف محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر وزن تر کالوس ترخون

(میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه می‌باشند تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.)

طول ساقه و ریشه

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که طول ساقه و ریشه گیاهچه باززایی شده در محیط کشت MS نسبت به سایر محیط‌های کشت برتری داشت و این صفات در محیط کشت‌های SH و B5 در رده‌های بعدی قرار گرفتند. برتری محیط کشت MS نسبت به دو محیط کشت دیگر به گونه‌ای بود که اختلاف بین این سه محیط کشت از نظر این دو صفت با هم معنی‌دار بود. طول ریشه در گیاهچه باززایی شده در محیط‌های کشت MS، SH و گامبورگ به‌ترتیب ۱/۲۸، ۱/۱۲ و ۰/۹۸ سانتی‌متر بود (جدول ۲). محیط کشت حاوی تیمارهای مختلف 2,4-D، NAA و کینتین باعث تشکیل شاخساره و ریشه در محیط‌های کشت ترخون شد. تیمارهای کاربرد توأم NAA+ کینتین و 2,4-D+ کینتین از نظر طول ساقه و ریشه نسبت به سه تیمار دیگر دارای برتری بودند. همچنین نتایج نشان داد که کاربرد کینتین به تنهایی سبب افزایش بیشتر طول ساقه به میزان ۱/۴ سانتی‌متر نسبت به دو تیمار دیگر شد. این افزایش برای ریشه در تیمار کاربرد توأم NAA+ کینتین نسبت به تیمار 2,4-D و کینتین به میزان ۲۴٪ بیشتر بود و نسبت به تیمار کاربرد تنهای NAA حدود ۱۱٪ بیشتر بود (جدول ۲).

وزن خشک ساقه و ریشه

بین محیط‌های کشت مختلف از نظر وزن خشک ساقه و ریشه اختلاف معنی‌دار وجود داشت و محیط کشت MS دارای بالاترین میزان وزن خشک ساقه و ریشه به‌ترتیب به میزان ۶/۵ و ۲/۶ گرم بود، به دنبال آن وزن خشک ساقه در محیط کشت‌های SH و گامبورگ به‌ترتیب ۵/۳ و ۴/۱ گرم بود (جدول ۲). کاربرد توأم کینتین با NAA و 2,4-D سبب شد که وزن خشک ساقه و ریشه نسبت به کاربرد تنهای آنها افزایش یافته، به‌طوری که وزن خشک ساقه و ریشه به‌ترتیب نسبت به تیمار کاربرد تنهای کینتین ۲۷٪ و ۲۶٪ افزایش یافت. وزن خشک ساقه و ریشه در تیمار کاربرد تنهای کینتین نسبت به کاربرد تنهای 2,4-D اختلاف معنی‌دار نداشت، ولی نسبت به کاربرد تنهای NAA

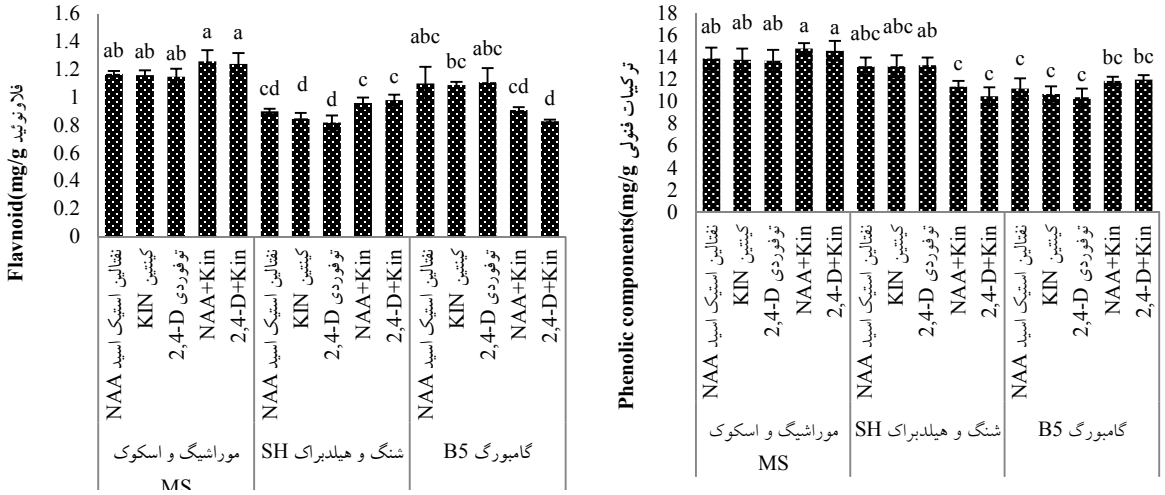
و کاربرد توأم آن با NAA و 2,4-D دارای اختلاف بودند. افزایش وزن خشک ریشه در تیمارهای کاربرد توأم کینتین با NAA و 2,4-D نسبت به تیمار کاربرد تنهای NAA و 2,4-D به‌ترتیب ۲۳٪ و ۴۸٪ بود (جدول ۲).

خصوصیات بیوشیمیایی

نتایج تجزیه واریانس مربوط به خصوصیات بیوشیمیایی کالوس نشان داد که اثر تیمار محیط کشت بر درصد فلاونوئید کل، ترکیب های فنولی، فنول کل، درصد اسانس و درصد استراگول در سطح احتمال ۱٪ معنی دار بود. همچنین اثر تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد بر درصد اسانس، درصد استراگول، اوسیمون، لیمونن و لینانول معنی‌دار بود. همچنین نتایج نشان داد که اثر متقابل محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات درصد فلاونوئید کل، ترکیب‌های فنولی، فنول کل و درصد استراگول معنی‌دار بود (جدول ۳).

محتوای فلاونوئید

در همه سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد بیشترین میزان فلاونوئید مربوط به محیط کشت MS بود. بالاترین میزان فلاونوئید به میزان ۱/۲۶ میلی‌گرم بر گرم مربوط به تیمار کاربرد توأم NAA+ کینتین بود. در دو محیط کشت MS و SH میزان فلاونوئید در تیمارهای کاربرد توأم NAA و 2,4-D با کینتین بیشتر از کاربرد تنهای این سه تنظیم‌کننده رشد بود، ولی در محیط کشت B5 بعکس بود و میزان فلاونوئید در تیمارهای کاربرد توأم NAA و 2,4-D با کینتین کمتر از کاربرد تنهای این سه تنظیم‌کننده رشد بود. با این حال تیمار 2,4-D در محیط SH دارای کمترین میزان فلاونوئید (۰/۸۳ میلی‌گرم بر گرم) بود که نسبت به بالاترین مقدار تولید شده تیمار کاربرد توأم NAA+ کینتین در محیط کشت MS مقدار ۳۵٪ کمتر بود (شکل ۳).



شکل ۳- اثر متقابل تیمارهای مختلف محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر ترکیب‌های فنولی و فلاونوئید کالوس ترخون

(میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه می‌باشند تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.)

جدول ۳- تجزیه واریانس خصوصیات بیوشیمیایی و ترکیب‌های اسانس ترخون در محیط کشت‌های مختلف (MS، B5 و SH)

با کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف (کینتین، NAA، 2,4-D، NAA + کینتین و 2,4-D + کینتین)

منابع تغییرات	درجه آزادی	فلاونوئید	ترکیب‌های فنولی	فنول تام	اسانس	استراگول	اوسیمون	لیمونن	لینانول
تکرار	۳	۰/۱۰۳	۱۰/۳۳	۰/۰۴۶	۰/۸۴	۴۶/۸	۳/۱۸	۰/۵۸	۰/۰۱۲
محیط کشت (a)	۲	۰/۴۴**	۴۴/۳**	۰/۱۹۴**	۱/۷۶**	۲۳/۱**	۲/۰۴**	۰/۴۱۱ns	۰/۰۰۹ns
تنظیم‌کننده رشد (b)	۴	۰/۰۰۲ns	۰/۲۹ns	۰/۰۰۱ns	۰/۶۳**	۴۷۷**	۲۳**	۱۷/۴**	۰/۴۶**
a*b	۸	۰/۰۴۷**	۴/۷۴**	۰/۰۱۸**	۰/۰۴ ns	۱۶/۸**	۰/۱۳۶ns	۰/۰۶۶ns	۰/۰۰۸ns
خطا	۴۲	۰/۰۱۵	۱/۵۶	۰/۰۰۶۲	۰/۰۴۲	۳/۹۱	۰/۱۹۵	۰/۲۲۴	۰/۰۰۹
ضریب تغییرات (٪)		۱۲/۰۳	۹/۹	۱۱/۵	۹/۷	۲/۹۱	۸/۱۴	۱۶/۷	۱۳/۴

ns و**: به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

ترکیب‌های فنولی و فنول کل

میزان ترکیب‌های فنولی در محیط کشت MS نسبت به دو محیط کشت دیگر بیشتر بود. در محیط کشت SH کاربرد توأم کینتین با NAA و 2,4-D سبب کاهش معنی‌دار میزان ترکیب‌های فنولی نسبت به کاربرد تنهای این سه تنظیم کننده رشد شد. در دو محیط کشت دیگر کاربرد توأم کینتین با NAA و 2,4-D سبب افزایش ترکیب‌های فنولی نسبت به سه تنظیم‌کننده رشد دیگر شد، ولی اختلاف میان آنها معنی‌دار نبود (شکل ۳). در محیط کشت SH کاربرد همزمان این تنظیم‌کننده‌های رشد سبب کاهش ترکیب های فنلی نسبت به کاربرد تنهای آنها شده است. محتوای فنول تام در محیط کشت MS نسبت به دو محیط کشت SH و B5 کمتر بود. بیشترین میزان فنول کل (۰/۸۳ میلی‌گرم بر گرم) مربوط به تیمار کاربرد 2,4-D در محیط کشت SH بود، در حالیکه کمترین میزان فنول کل (۰/۵۴ میلی گرم بر گرم) مربوط به کاربرد آن در محیط کشت MS بود و اختلاف بین این دو معنی دار بود (شکل ۴).

درصد اسانس و آنالیز ترکیب‌های آن

نتایج نشان داد که درصد اسانس ترخون در محیط های کشت مختلف متفاوت بود. درصد اسانس ترخون در سه محیط کشت MS، SH و B5 به‌ترتیب ۲/۴۲٪، ۲/۱۲٪ و ۱/۸۳٪ بود. این نتایج بیانگر برتری محیط کشت MS از نظر تولید اسانس در گیاهچه باززایی شده بود. میزان اسانس ترخون در محیط کشت MS ۲/۴۲٪ بود که در محیط کشت B5 به حدود ۷۵٪ این میزان یعنی ۱/۸۳٪ رسید. کاربرد توأم کینتین با NAA و 2,4-D سبب شد که تولید اسانس در گیاهچه باززایی شده ترخون به‌طور معنی داری نسبت به کاربرد تنهای آنها افزایش یافته و در این دو تیمار به‌ترتیب به ۲/۴٪ و ۲/۲٪ برسد. تیمار 2,4-D نسبت به سایر تیمارهای تنظیم‌کننده رشد دارای مقدار اسانس تولیدی کمتری (۱/۸٪) بود (جدول ۴). تجزیه ترکیب‌های مختلف موجود در اسانس ترخون با استفاده از دستگاه HPLC نشان داد که بیشترین درصد اجزای ترکیب های اسانس مربوط به استراگول بود و بیشترین میزان استراگول (۷۸٪) موجود در اسانس در محیط کشت SH و در تیمار ترکیبی 2,4-D+ کینتین بود. این تیمار با تیمار ترکیبی 2,4-D+ کینتین در محیط کشت MS (۷۷٪) و محیط کشت B5 (۷۴٪) و همچنین با کاربرد تنهای 2,4-D در محیط کشت MS (۷۴٪) اختلاف معنی‌داری نداشت.

آنچه مشهود می‌باشد این است که در محیط‌های مختلف کشت، کاربرد 2,4-D نسبت به دو تنظیم‌کننده رشد دیگر اثر بیشتری بر درصد استراگول اسانس ترخون داشت و مقدار استراگول در ترکیب 2,4-D با کینتین افزایش بیشتری نشان داد (شکل ۴). درصد اوسیمون موجود در اسانس ترخون در دو محیط کشت SH (۵/۲۸٪) و گامبورگ (۵/۱۸٪) با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند، ولی با محیط کشت MS (۵/۷۸٪) اختلاف معنی‌دار داشتند. این نتایج بیانگر برتری محیط کشت MS نسبت به دو محیط کشت دیگر از نظر درصد اوسیمون موجود در اسانس ترخون بود (جدول ۴). درصد اوسیمون موجود در اسانس گیاهچه باززایی شده ترخون در تیمارهای کاربرد تنهای 2,4-D، کینتین و NAA به‌ترتیب ۳/۷٪، ۳/۹٪ و ۶/۶٪ بود. کاربرد کینتین به همراه NAA و 2,4-D سبب افزایش میزان اوسیمون در اسانس ترخون شد،

جدول ۴- مقایسه میانگین خصوصیات بیوشیمیایی و ترکیب‌های اسانس ترخون در محیط کشت‌های مختلف (MS، B5 و SH) با کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف (کینتین، NAA، 2,4-D، NAA + کینتین و 2,4-D + کینتین)

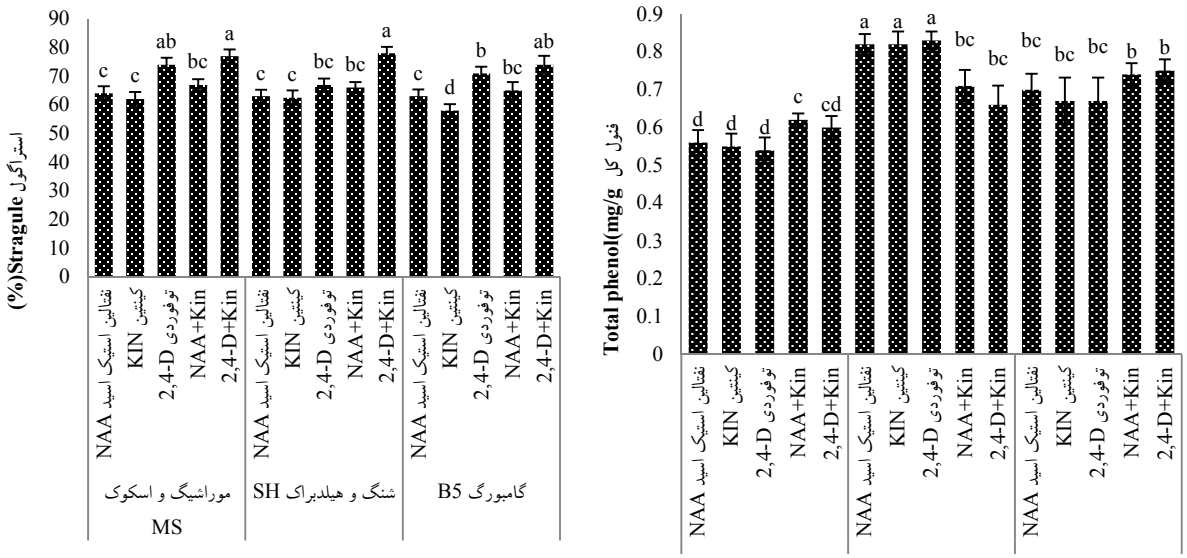
تیمارها	اسانس (٪)	اوسیمون (٪)	لیمونن (٪)	لینانول (٪)
محیط				
موراشیگ و اسکوک (**MS**)	۲/۴۲a	۵/۷۸a	۲/۹a	۰/۵۱a
شنک و هیلدبراک (**SH**)	۲/۱۲b	۵/۲۸b	۲/۶a	۰/۵۰a
گامبورگ (**B5**)	۱/۸۳c	۵/۱۹b	۲/۸a	۰/۵۴a
تنظیم‌کننده‌های				
نفتالین استیک اسید (**NAA**)	۲bc	۶/۶b	۴/۴a	۰/۶۹b
کینتین (**Kin**)	۱/۹cd	۳/۹d	۱/۸d	۰/۳۵d
توفوردی (**2,4-D**)	۱/۸d	۳/۷d	۱/۷d	۰/۳۵d
NAA+Kin	۲/۴a	۷/۶a	۳/۷b	۰/۴۶c
2,4-D+Kin	۲/۲b	۵/۱c	۲/۳c	۰/۷۷a

میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه می‌باشند تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

به‌طوری که بیشترین میزان اوسیمون موجود در اسانس ترخون به میزان ۷/۶٪ در تیمار کاربرد کینتین به همراه NAA بود و با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت (جدول ۴). درصد لیمونن موجود در عصاره با کاربرد NAA به بالاترین میزان خود رسید، با این تفاوت که کاربرد تنهای NAA سبب تولید میزان لیمونن بیشتری (۴/۴٪) در عصاره ترخون شد، در حالیکه کاربرد 2,4-D به همراه کینتین سبب شد میزان لیمونن بیشتری (۲/۳٪) نسبت به کاربرد تنهای 2,4-D (۱/۷٪) حاصل شود (جدول ۴). درصد لینانول نیز در اسانس ترخون در تیمار کاربرد 2,4-D+ کینتین (۰/۷۷٪) نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. تیمار NAA نسبت به دو تیمار دیگر درصد لینانول بیشتری (۰/۶۹٪) داشت و کمترین درصد لینانول (۰/۳۵٪) مربوط به کاربرد کینتین بود. کاربرد کینتین به همراه 2,4-D سبب افزایش درصد لینانول نسبت به کاربرد تنهای آن شد، در حالیکه درصد لینانول در تیمار کاربرد NAA به همراه کینتین نسبت به کاربرد تنهای NAA کاهش یافت (جدول ۴).

بحث

این تحقیق با هدف مطالعه اثر محیط کشت‌های متفاوت (MS، B5 و SH) و همچنین تنظیم‌کننده‌های رشد شیمیایی (کینتین، NAA، 2,4-D، ترکیب NAA + کینتین و ترکیب 2,4-D + کینتین) اثرهای قابل ملاحظه‌ای را بر صفات رشدی و ترکیب‌های بیوشیمیایی گیاه دارویی ترخون در شرایط درون شیشه‌ای مشخص نمود.



شکل ۴- اثر متقابل محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر میزان فنول کل و درصد استراگول موجود در اسانس ترخون

(میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه می‌باشند تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.)

کالوس

نتایج حاصل از تحقیقات مشخص نمود که قدرت کال‌زایی در محیط کشت MS نسبت به B5 بیشتر می‌باشد که می‌تواند به دلیل بیشتر بودن غلظت مواد معدنی موجود در این محیط باشد (Koohi *et al*., 2015). در این زمینه در مطالعه‌ای روی کنگرفرنگی در محیط کشت MS بیشترین نسبت و بازده کالوس‌دهی در ترکیب NAA و BAP حاصل شد (Tanoori *et al*., 2015). در گیاه *D. purpurea* جایگزین کردن NAA به‌عنوان یک اکسین مصنوعی به جای IAA باعث افزایش رشد کالوس می‌گردد (Palazon *et al*., 1995). اکسین‌ها با تحریک اسیدی شدن دیواره سلولی منجر به افزایش انبساط‌پذیری آن شده و با القاء رونویسی mRNAهای رمزکننده پروتئین‌های مرتبط با رشد سلولی بر رشد اولیه کالوس اثر می‌گذارند (Koohi *et al*., 2015). وزن تر کالوس به‌طور گسترده به‌عنوان معیاری از رشد کالوس‌ها مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد. در گیاه مرزنجوش (*Origanum vulgare*) محیط کشت MS سبب افزایش وزن تر و خشک کالوس شد و کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی در این محیط کشت سبب افزایش بیشتر وزن تر کالوس شد (Hosseini & Bighamat, 2017) که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت. تأثیر وجود اکسین به تنهایی و یا در حضور سیتوکینین می‌تواند به‌دلیل تفاوت در وجود تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی درون‌زا در گیاه باشد (Hosseini & Bighamat, 2017). در کشت بافت گیاه سیب‌زمینی بالاترین وزن تر کالوس مربوط به تیمار یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D در محیط کشت بود (Yasmin *et al*., 2003).

درصد باززایی

اکسین یکی از تنظیم‌کننده های رشد گیاهی است که برای فعال‌سازی تقسیم سلولی در سلول‌های گیاهی تمایزیافته در شرایط کشت بافت مورد نیاز می‌باشد. در این مطالعه نیز ترکیب تنظیم کننده‌های رشد NAA با کینتین بیشترین درصد باززایی را بدست آوردند، در حالیکه همین تیمار با تیمار

کاربرد توأم 2,4-D و کینتین اختلاف معنی داری نداشت. سیتوکینین‌هایی مانند کینتین و همچنین تنظیم کننده‌های رشد اکسینی اضافه شده به محیط کشت سبب افزایش باززایی برنج ایندیکا شدند (Zaidi *et al*., 2006). موفقیت سریع در اندام‌زایی احتمالاً با قابلیت طبیعی گیاه در باززایی همبسته می باشد و در این تحقیق به نظر می‌رسد که گیاه ترخون دارای قابلیت بالایی در باززایی در محیط های یادشده با استفاده از تنظیم‌کننده های رشد بکاربرده شده به‌ویژه NAA و 2,4-D به همراه کینتین را نشان داد. نتایج این تحقیق نشان داد که محیط کشت MS و کاربرد NAA نسبت به دو تنظیم‌کننده رشد دیگر طول ریشه را در گیاهچه باززایی شده ترخون بیشتر افزایش داد. در گیاه به‌لیمو محیط کشت MS سبب شد طول ریشه و ساقه نسبت به محیط کشت گامبورگ افزایش بیشتری پیدا کند (Nourafcan & Ansari, 2016). محیط کشت MS نسبت به سایر محیط‌های کشت از نظر شاخه‌زایی در *Rosa damascena* دارای برتری بود (Asareh *et al*., 2007). دلیل این امر بالاتر بودن قدرت یونی محیط MS نسبت به سایر محیط‌ها عنوان شده است (Asareh *et al*., 2007). گرچه شاخه‌های گونه *R. multiflora* در محیط WPM رشد می‌کنند، ولی نسبت به محیط کشت MS از نمو کمتری برخوردارند (Vandersalm *et al*., 1994). به‌هرحال در این مطالعه مشخص شد که طول ریشه در تیمار کاربرد NAA به تنهایی بیشتر از کینتین و 2,4-D به تنهایی بود و بیانگر تحریک بیشتر تولید ساقه با کاربرد این تنظیم‌کننده رشد می‌باشد. اکسین‌ها بیشتر برای القای ریشه‌زایی و نه رشد مداوم مورد استفاده قرار می‌گیرند (Morzadec & Hourmant, 1997). در گیاهچه باززایی شده از گل شب‌بو بلندترین طول ریشه در محیط حاوی NAA به همراه کینتین مشاهده شده است (Kaviani *et al*., 2014) که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت. تنظیم‌کننده رشد NAA به‌منظور ریشه‌زایی در محیط کشت استفاده می‌شود (Trejo-Tapia *et al*., 2002).

وزن خشک ساقه و ریشه

کاربرد توأم کینتین به همراه دو تنظیم کننده رشد دیگر بدین دلیل سبب افزایش وزن خشک ریشه و اندام هوایی شده است که کینتین از تنظیم کننده‌های رشد سیتوکینین بوده که سبب افزایش تقسیم سلولی و در نتیجه افزایش تعداد سلول‌ها و در نهایت افزایش وزن خشک آنها شده است و کاربرد کینتین به همراه NAA اثر بیشتری بر وزن خشک ریشه نسبت به وزن خشک اندام هوایی داشت. در مطالعه‌ای محیط کشت MS سبب افزایش وزن اندام هوایی گیاهچه‌های باززایی شده از کالوس شده است (Roozban *et al*., 2002) که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت. دلیل افزایش وزن خشک اندام هوایی در این محیط کشت تولید برگ‌های درشت‌تر عنوان شده است (Bell *et al*., 2009). آنان همچنین بیان کردند که یکی دیگر از دلایل برتری محیط کشت MS میزان بیشتر یون‌های آمونیوم، نیترات و کلر موجود در این محیط کشت می باشد. افزایش تعداد برگ در بوته نیز یکی از دلایل افزایش وزن خشک ساقه در محیط کشت مذکور تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد می‌باشد، زیرا محیط کشت اثر معنی داری بر تعداد برگ در بوته داشته که این اثر با کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد افزایش بیشتری داشته است. علاوه‌بر تعداد بیشتر برگ، اندازه درشت‌تر برگها نیز سبب افزایش وزن خشک اندام‌های هوایی باززایی شده می‌گردد که این مورد نیز تحت تأثیر کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد قرار می‌گیرد (Bell *et al*., 2009). در مطالعه‌ای روی گیاه به‌لیمو (*Aloysia citrodora*) مشخص شد که وزن خشک ساقه و ریشه این گیاه در محیط کشت MS نسبت به محیط کشت B5 بیشتر بود و نشان از برتری این محیط در کشت بافت به‌لیمو داشت (Nourafcan & Ansari, 2016). در ریزازدیادی گوجه‌فرنگی مشخص شد که ترکیب NAA+ کینتین در محیط کشت MS سبب افزایش بیشتر وزن اندام هوایی و میوه گیاهچه باززایی شده از کشت بافت شد (Atrashi & Karimi Dehkordi, 2015) که با نتایج حاصل از این

تحقیق مطابقت داشت. همچنین باید در نظر داشت که علت ضعف محیط کشت B5 نسبت به دو محیط کشت دیگر در کشت بافت ترخون، وجود میزان کم یون نیترات در این محیط می‌باشد (Taji *et al*., 1997). همچنین کاربرد توأم هورمون‌های رشد از قبیل NAA+ کینتین و 2,4-D+ کینتین سبب افزایش وزن خشک ریشه و ساقه نسبت به کاربرد تنهای آنها شد. در بین تیمارهای کاربرد تنهای تنظیم‌کننده های رشد نیز NAA بیشترین اثر را بر وزن خشک ریشه و اندام هوایی داشت. کاربرد توأم کینتین به همراه دو هورمون دیگر بدین دلیل سبب افزایش وزن خشک ریشه و اندام هوایی شده است که کینتین از هورمون‌های سیتوکینین بوده که سبب افزایش تقسیم سلولی و در نتیجه افزایش تعداد سلول‌ها و در نهایت افزایش وزن خشک آنها شده است. البته باید توجه کرد که کاربرد کینتین به همراه NAA اثر بیشتری بر وزن خشک ریشه نسبت به وزن خشک اندام هوایی داشت. این نتایج از نتایج حاصل از طول ریشه و اندام هوایی تحت تأثیر این تیمارها قابل پیش‌بینی بود.

ترکیب‌های بیوشیمیایی

آنچه مسلم است این است که محیط کشت MS و B5 به همراه تنظیم‌کننده های رشد یادشده دارای اثر افزاینده بر تولید ترکیب های فنلی بوده که سبب افزایش معنی‌دار آن شده است، در حالیکه محیط کشت SH به همراه تنظیم‌کننده‌های کشت یادشده دارای اثر بازدارنده بر تولید ترکیب های فنلی هستند و به‌همین دلیل در این تیمارها تولید ترکیب‌های فنلی نسبت به کاربرد تنهای تنظیم‌کننده های رشد در محیط کشت SH کاهش یافته است. به نظر می‌رسد که کاربرد همزمان کینتین و اکسین باعث تغییر در میزان تانن‌ها و در نتیجه افزایش میزان ترکیب‌های فنلی شده است (Asghari *et al*., 2015). افزودن کینتین به محیط کشت باعث افزایش توده تولید شده و بیوسنتز ترکیب‌های فنلی شد و افزودن اکسین به نمونه‌هایی که محتوای اسیدجیبرلیک و سیتوکینین‌ها بودند موجب افزایش ترکیب‌های فنلی گردید (Jeong *et al*., 2007). کینتین بیوسنتز ترکیب های فنلی را افزایش داده است که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت (Jeong *et al*., 2007). البته افزایش تولید و تجمع فنول و ترکیب‌های فنولی در کالوس ترخون را می‌توان به پاسخ‌های دفاعی که توسط این محرک‌ها القاء می‌گردد، نسبت داد (Mehrabani *et al*., 2013). فعالیت آنتی‌اکسیداتیو گیاه ممکن است با قدرت احیاکنندگی و محتوای فنلی آن رابطه مستقیم داشته باشد (Asareh *et al*., 2007). همچنین رابطه مثبتی بین محتوای فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها وجود دارد (Ghasemzadeh *et al*., 2010). سیتوکینین با القای تمایز در سلول‌ها منجر به افزایش تولید ترکیب‌های فلاونوئیدی در بافت‌ها می‌شود (Verma & Sen, 2009). در مطالعه‌ای روی گیاه *Artemisia aucheri* مشخص شد که استفاده از کینتین و اکسین باعث تغییر در میزان ترکیب های فلاونوئیدی در تمام تیمارها شده است (Asghari *et al*., 2015).

درصد اسانس و آنالیز ترکیب‌های آن

به نظر می‌رسد که تأمین عناصر ضروری در محیط کشت گیاه سبب شده گیاه از نظر عناصر تغذیه‌ای قوی‌تر و ماده‌سازی بیشتری در آن رخ داده باشد که در این مطالعه در محیط کشت MS این برتری مشاهده شد. البته کاهش میزان اسانس ممکن است به‌دلیل اختلال در فتوسنتز و تولید کربوهیدرات در محیط کشت‌های ضعیف‌تر باشد (Flexas & Medrano, 2002). کاربرد کینتین به‌عنوان منبع سیتوکینین سبب شد میزان اسانس گیاه ترخون افزایش یابد که احتمالاً به‌دلیل محدود شدن منبع سیتوکینین برای تولید اسانس می‌باشد. کاهش فعالیت و انتقال تنظیم‌کننده رشد سیتوکینین از ریشه به شاخه‌ها و برگ‌ها با تغییر نسبت میان اسید آبسیزیک و سیتوکینین سبب کاهش میزان اسانس در گیاه ترخون می‌شود (Lamina *et al*., 2016). افزایش فعالیت فتوسنتزی در ارتباط با مهمترین بخش فتوسنتزکننده در گیاه یعنی

برگ‌ها بوده، به‌طوری که تأمین منابع فتوسنتزی باعث افزایش سطح برگ می‌شود که این افزایش به تولید بیشتر غده‌های ترشح‌کننده اسانس در برگ منجر شده و میزان اسانس نیز افزایش یافته است (Sifola & Barbieri, 2006). همچنین با افزایش تعداد و سطح برگ، تعداد روزنه به‌عنوان محل ورود دی‌اکسیدکربن و گلوکز به‌عنوان پیش‌ماده مناسب در سنتز اسانس‌ها و به‌عنوان نتیجه فرایند فتوسنتز زیاد شده، در نتیجه سوبسترای لازم برای سنتز اسانس در گیاه فراهم می‌شود (Sangwan *et al*., 2001). بیشترین میزان ماده مؤثره در اسانس ترخون مربوط به استراگول بوده که بیش از ۶۰٪ ماده مؤثره را در این گیاه تشکیل داده است (Duke, 2001). در هر سه محیط کشت کاربرد تنظیم‌کننده رشد کینتین به تنهایی سبب شد که میزان استراگول موجود در اسانس به کمترین میزان خود کاهش یابد. ترکیب های مختلف موجود در اسانس ترخون تحت تأثیر تنظیم‌کننده های رشد قرار گرفتند، به‌طوری که کاربرد تنظیم‌کننده های رشد سبب کاهش درصد استراگول و افزایش اوسیمون، لیمونن و لینانول شده است (Pazoki *et al*., 2008). درصد استراگول و اوسیمون موجود در اسانس ترخون تحت تأثیر محیط کشت و تنظیم‌کننده های رشد قرار گرفت، در حالیکه درصد لیمونن و لینانول موجود در اسانس فقط تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد قرار گرفت.

تنظیم‌کننده‌های رشد IAA و NAA سبب افزایش بازده اسانس ترخون شده و سبب تغییر در میزان استراگول آن می‌گردد (El-Khateeb, 1994). تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و IAA سبب افزایش مونوترپن‌های اسانس ازجمله لیمونن و اوسیمن در گیاه ترخون شده است (Pazoki *et al*., 2008). البته میزان منتول *Mentha Piperita* با فراهمی برخی مواد ضروری افزایش یافته است (Misra & Sharma, 1991). ترکیب‌های اصلی موجود در اسانس گیاه دارویی آلپینیا (*Alpinia zerumbet*) از قبیل لینانول و کامفور و کومین آلدئید در محیط با مواد غذایی مورد نیازش نسبت به تیمار شاهد افزایش یافته است (Abdelnaser *et al*., 2007). در مورد افزایش ترکیب های موجود در اسانس گیاه ترخون در تیمارهای یادشده می‌توان بیان نمود که در تیمارهای یادشده افزایش این ترکیب ها به احتمال زیاد در ارتباط با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه بوده که با کیفیت بالای اسانس آن نیز مرتبط می‌باشد. این نتایج با یافته‌های سایر محققان نیز مطابقت دارد که به‌دلایل مشابهی در این مورد اشاره کرده‌اند (Hadian *et al*., 2016). در مطالعه‌ای میزان گلیکوزید موجود در اسانس برگ استویای حاصل از کشت بافت با گیاه مادری با استفاده از دستگاه HPLC مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که در شرایط کشت بافت میزان این ترکیب نسبت به گیاه مادری افزایش یافته است (Muanda *et al*., 2011).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که محیط کشت‌های مختلف و تنظیم‌کننده‌های رشد دارای اثرهای متفاوتی بر رشد کالوس، باززایی و تولید اسانس در ترخون بودند و محیط کشت MS از این نظر دارای برتری بود و سبب افزایش صفات یادشده شد. درصد باززایی، طول و وزن خشک ریشه و ساقه، میزان فلاونوئید، ترکیب های فنولی، میزان اسانس و درصد اوسیمون اسانس در محیط کشت MS و کاربرد توأم تنظیم‌کننده‌های رشد NAA+ کینتین و 2,4-D+ کینتین بیشتر از سایر تیمارها بود. میزان فنول در محیط کشت SH بیشتر از سایر محیط‌ها بود و کاربرد تنهای تنظیم‌کننده های رشد بر کاربرد توأم آنها از این نظر برتری داشت. با توجه به این نتایج می توان بیان کرد که در کشت بافت گیاه ترخون با استفاده از محیط کشت MS و با کاربرد توأم کینتین با تنظیم‌کننده‌های رشدی از قبیل NAA و 2,4-D می‌توان علاوه بر افزایش رشد و ماده خشک اندام هوایی گیاهچه باززایی شده میزان اسانس بیشتری نیز بدست آورد.

منابع مورد استفاده

- Abdelnaser, A., Elzaawely, T., Xuan, D. and Shinkichi T., 2007. Changes in essential oil, kava pyrones and total phenolics of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt. and R. M. Sm. leaves exposed to copper sulphate. Environmental and Experimental Botany, 59: 347-353.
- Alizadeh, M., 2012. Tissue culture and micropropagation manual. Norouzi Press, Gorgan, Iran, 322p.
- Amany, K., Ibrahim, S. and Ahmed, A., 2011. Efficient callus induction, plant regeneration and estragole estimation in tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). Journal of Essential Oil Research, 23: 16-20.
- Asareh, M.H., Gharbanli, M., Allahverdi Mamaghani, B., Zare, A. and Shahrzad, Sh., 2007. Effect of culture medium and plant growth regulators on *in-vitro* propagation of Rose. Research and Convinience, 72: 45-51.
- Asghari, G.R., Ghasemi, R., Yousefi, M. and Mahdinejad, N., 2015. Effect of PGRs and kitozan on phenolic components in callus and seedling of dermane. Plant Process and Function Journal, 3(10): 93-100.
- Atrashi, M. and Karimi Dehkordi, R., 2015. Study on different concentration of PGRs on micropropagation of tamato at *in-vitro* condation. Green Scince Prin Journal, 5(19): 127-133.
- Bell, R.L., Srinivasan, C. and Lomberk, D., 2009.Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. In vitro Cell Devission Biology, 45: 708-714.
- Chang, Y.L., Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J. and Lee, C.Y., 2002. Vitamin C equivalentanti oxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. Journal of Agriculture and Food, 50(13): 3713-3717.
- Chappell, J., 1995. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway. Annals in Review in Plant Physiology and Molocular Biology, 46: 521-547.
- Morzadec, J.M. and Hourmant, A., 1997. In vitro rooting improvement of globe artichoke (cv. Camus de Bretagne) by GA3. Scientia Horticulturae, 72: 59-62.
- Diettrich, B., Mertinat, H. and Luckner, M., 1990. Formation of *Digitalis lanata* clone lines by shoot tip culture. Planta Medicine, 56: 53-58.
- Duke, J.A., 2001. Handbook of Medicinal Herb*s*. CRC Press, LLC.USA, 896p.
- El-Khateeb, M.A., 1994. Effect of some growth regulators on growth, fruit yield and essential oil in dill plant. Bulltein of Faculty of Agriculture University of Cairolina, 45: 187-205.
- Flexas, J. and Medrano, H., 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and nonstomatal limitations revisited. Annals of Botany, 89: 183-89.
- Trejo-Tapia, G., Amaya, U.M., Guadalupe, S.M., Sánchez, A.D.J., Martínez, B., Rodríguez-Monroy, M. and Jiménez-Aparicio, A.R., 2002. The effect of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 71: 41-46.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z. and Rahmat, A., 2010. Antioxidant activities, total henolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Molecule, 15(6): 4324-4333.
- Hadian, J., Asgari-Lajayer, H., Moteshare-zadeh, B. and Ghorbanpour, M., 2016. Evaluation of essential oils content and yield of Satureja hortensis in response to different copper and zinc treatments. Iranian Journal of Plant Biology, 7(24): 53-66.
- Hosseini, B. and Bighamat, A., 2017. Effects of different concentrations of growth regulators and explants type on callus induction, embryogenesis and shoot regeneration of *Origanum vulgare* ssp. Gracile. Iranian Journal of Renglands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 24(2): 264-276.
- Jeong, G.T., Woo, J.C. and Park, D.H., 2007. Effect of plant growth regulators on growth and biosynthesis of phenolic compounds in genetically transformed hairy roots of *Panax ginseng* C. A. Meyer. Biotechnology and Biopathology Enginereeng, 12: 86-91.
- Karimi, M., Kazemitabar, S.K., Azadbakht, M. and Nematzadeh, G., 2015. Study of tissue culture of digitaris. Crop Breeding Journal, 6(13): 18-28.
- Kaviani, B., Ahmadi, A., Torang, A.R., Bohluli, S. and Hashemabadi, B., 2014. Effect of NAA and kinetin on micropropagation of Sabbu. Plant Science Research Journal, 8(2): 32-39.
- Keikhaakhar, F., Khadem, A. and Sharifi, A., 2013. Improving of tissue culture of *Lavandula angustifolia* Mill. 3rd Iranian Agricultural Biotechnology Conference, Mashhad, Iran, 3 September, 5p.
- Kiarostami, K. and Mosafa, N., 2016. Srudy of antioxidant benefits of *angustifolia* under *in-vitro* condition. Plant Science Research Journal, 8(4): 835-843.
- Koohi, L., Zare, N., Asgharizakaria, R. and Sheykhzadeh, P., 2015. Role of plant growth

Digitalis callus. Plant Cell Physiology, 36(2): 247-252.
- Pazoki, A., Fahimi, H. and Shakeri, H., 2008. Effact of NAA and IAA on quality and quantity of essential oil of tarragon. Research Convenience Journal, 74: 124-128.
- Renata, N.W. and Grażyna, Z., 2014. Herb yield and bioactive componds of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) as influenced by plant density. Acta scientiarum Polonorum. Hortorum cultus, 13(2): 207-221.
- Roozban, M.R., Arzani, K. and Moieni, A., 2002. Study on in vitro propagation of some Asian pear. Pakistan Journal of Biological Science, 10(22): 4118-4122.
- Sangwan, N., Farooqi, A.H.A., Shabih, F. and Sangwan R.S., 2001. Regulation of essential oil production in plants. Journal of Plant Growth Regulator, 34: 3-21.
- Sayyah, M., Nadjafinia, L. and Kamalinejad, M., 2004. Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacology, 94(2): 283-287.
- Sifola, M. and Barbieri, G., 2006. Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. Sciencia Horticulture, 108: 408-413.
- Taji, A.M., Dodd, W.A. and Williams, R.R., 1997. Plant Tissue Culture Practice. University of New England press, Armidale, Australia, 258p.
- Tanoori, A., Ghaseemnejad, A. and Alizadeh, M., 2015. Effect of Metiljasmonat and salisilic acid on morphological traits and choromoplast of Kangar callus. Agricultural Behzeraee Journal, 16(4): 857-869.
- Tatari, M., Asgari, N. and Nosrati, S.Z., 2010. Improving of in-vitro culture of Gerbera cv. Tropical Blend Agriculture Behzeraee Journal, 25(4): 389-401.
- Tripathi, L. and Tripathi, J.N., 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmacy Research, 2(2): 243-253.
- Vandersalm, T.P.M., Vandertorn, C.J.G. and Hanischtencate, C.H., 1994; Importance of iron chelate formula for micropropagation of *Rosa hybrida* L. money way. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 37: 73-77.
- VanStaden, D., 2008. Plant growth regulators, II: cytokinins, their analogues and inhibitors: 205-226. In: George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J., (Eds.). Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1, The Background. Springer, 477p.
regulators on tissue culture response and cell suspension of Babune. Crop Ecophysiology Journal, 2(30): 203-214.
- Kumari, N. and Saradhi, P., 1992. Regeneration of plants from callus cultures of *Origanum vulgare*. Plant Cell Reproductive, 11(9): 476-479.
- Lamina, A., Naghdibadi, H., Ladan-Moghadam, A. and Mehrafarin, A., 2016. Changes of morphophysiological traits, essentioal oil and methylchavichol of tarragon in response to micorhyza inoculation and salt stress. Medicinal Plant Journal, 14(4): 64-77.
- Mehrabani, B., Nazeri, S. and Piri, K., 2013. Assesing of total phenol in muintane tea via tissue culture and possibility of it increasing with stimulators. Agriculture Biotechnology Journal, 4(2): 77-88.
- Misra, A. and Sharma, S., 1991. Critical Zn concentration for essential oil yield and menthol concentration of Japanese mint. Fertilizer Research, 29: 261-265.
- Muanda, F.N., Soulimani, R., Diop, B. and Dicko, A., 2011. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. LWT-Food Science and Technology, 44(9): 1865-1872.
- Munsur, M., Haque, M. and Nasiruddin, K., 2009. In vitro propagation of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) from nodal and root segments and M.S. Hossain. Plant Tissue Culture Biotechnology, 19(1): 45-52.
- Nabila, S., Fawzia, M., Naser, A. and Rida, A., 2003. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 73: 117-121.
- Nikolaeva, T.N., Zagoskina, N.V. and Zaprometov, M.N., 2009. Production of phenolic compounds in Callus Cultures of Tea plants under the effect of 2,4-D and NAA. Russian Journal of Plants Physiology, 56(1): 45-49.
- Nourafcan, H. and Ansari, F., 2016. The effect of MS and B5 media on growth indices of *lemon verbena* in in vitro condition. Iranian Journal of Horticultural Science, 48(1): 249-252.
- Olszewska-Kaczynska, I. and Suchorska, K., 1996. Characterization of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) cultivated in Poland. Herba Polanica, 42: 5-10.
- Omidbeigi, R., 2010. Production and Prossesing of Medicinal Plants Facts (Vol. 2). Astan Ghods Razavi, 424p.
- Palazon, J., Bonfill, M. Cusido, R.M., Pinol, M.T. and Morales C., 1995. Effect of auxin and phenobarbital on morphogenesis and production of digitoxin in

- Verma, P. and Sen, N.L., 2009. The impact of plant growth regulators on growth and biochemical constituents of coriander (*Coriandrum sativum* L.). Journal of Herbs Spices & Medicinal Plants, 14: 144-153.
- Wani, M., Pande, S. and More, M., 2010. Callus induction studies in *Tridax procumbents*. International Journal of Biotechnology Application, 2(1): 11-14.
- Wu, Y., Taylor, K., Biswas, N. and Bewtra, J., 1998. A model for the protective effect of additives on the activity of horseradish peroxidase in the removal of phenol. Enzyme and Microbial Technology, 22(5): 315-322.
- Yasmin, S., Nasiruddin, K.M., Begum, R. and Talukder, SK., 2003. Regeneration and establishment of potato plantlets through callus formation with BAP and NAA. Asian Journal of Plant Science, 2: 936-940.
- Yen, Y.K., Lee, S.Y., Woo, T.P., Park, N. and Park, S., 2010. Exogenous auxins and polyamines enhance growth and rosmarinic acid production in root cultures of *Nepeta cataria* L. Plant Omics Journal, 3(6):190-193.
- Zaidi, M.A., Narayanan, R., Sardana, I., Taga, S., Postel, R., Johns, M., McNulty, Y., Mottiar J., Mao, E., Loit, I. and Altosaar I., 2006. Optimizing tissue culture media for efficient transformation of different indica rice genotypes. Agronomy Research, 4(2): 563-575.

Effects of culture medium and growth regulators on growth traits and secondary metabolites of *Artemisia dracunculus* L. under *in vitro* conditions

Y. Shakoori[1] and B. Kashefi[2*]

1- Graduated student, College of Agriculture, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran
2*- Corresponding author, College of Agriculture, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran
E-mail: bahareh.kashefi@gmail.com

Received: August 2018 Revised: March 2019 Accepted: March 2019

Abstract

Considering the importance of medicinal properties of tarragon, and its propagation problems, tissue culture techniques can be used for its propagation. The aim of this study was to compare different culture media and chemical plant growth regulators on the growth traits and secondary metabolites of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). Treatments were culture medium at three levels of Murashige and Skoog (MS), Gamborg (B_5) and Schenk & Hildebrandt (SH), and growth regulators at five levels of Kinetin (KIN), NAA, and 2,4-D alone (each with a concentration of 0.5 mg l^{-1}), and two combinations of NAA+KIN and 2,4-D+KIN. The present study was conducted as a factorial based on completely randomized design with four replications. The results showed that culture media and growth regulators treatments had significant effects on callus characteristics, regenerated plantlets, callus secondary metabolites, and plant essential oil and its composition. MS medium caused a higher callus induction percentage and more increase in its fresh and dry weight. MS with NAA+KIN and 2,4-D+KIN caused the highest regeneration percentage (35.5), root length (1.28 cm), root (6.5 g) and stem (2.6 g) dry weight, the amount of callus phenolics, and also the amount of essential oil (2.42%) and ocimene (5.78%). Estragol percentage of essential oil increased by 2,4-D, while NAA enhanced ocimene, limonene, and linalool. The percentage of limonene in treatment with NAA alone and linalool in treatment with 2,4-D+ KIN was higher than those of other treatments. The results showed that the highest growth index, callus secondary metabolites, and plant essential oil were observed in MS medium containing growth regulators. Also, the application of kinetin with NAA and 2, 4-D resulted in improved callus growth, regeneration, essential oil, and some of its compounds production in tarragon.

Keywords: Essential oil, auxine, callus, tissue culture, medicinal plant, cytokinin.