مجله زراعت واصلاح نباتات
جلد۷، شماره۱، بهار ۱۳۹۰
صفحات ۵۴ – ۴۵

بررسی کال‌زایی در گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)

Callusogenesis investigation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.)

محمدمصطفی سلطانی پول[۱]، عبداله محمدی[۱]، حسن رهنما[۲]، بهلول عباس‌زاده[۳]

چکیده

در این تحقیق القای کالوس در گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) در شرایط *In vitro*، به عنوان یکی از مقدمات اصلاح این گیاه پرکاربرد مورد نظر بود. بدین منظور از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با فاکتورهای اکوتیپ (اصفهان و کرج)، منشأ ریزنمونه (برگ، دمبرگ و میانگره)، هورمون 2,4-D (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، هورمون BAP (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و شرایط روشنایی (نور و تاریکی) در سه تکرار استفاده شد. نتایج آزمایش نشان داد که برای القای کالوس در گیاه دارویی بادرنجبویه بهترین تیمار هورمونی مربوط به استفاده از ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، برای ریزنمونه میانگره و دمبرگ در شرایط روشنایی می‌باشد. پس از این تیمار، استفاده از ریزنمونه برگی با تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیترهورمون 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، در شرایط تاریکی و سپس نور، تیمار پر بازده‌ای بود.

واژه‌های کلیدی: بادرنجبویه، کالوس، 2,4-D، BAP

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحدکرج، گروه اصلاح نباتات، کرج، ایران
۲- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج
۳- موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

بادرنجبویه یکی از گیاهان دارویی است که به دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه و اهمیت بسیاری که در مصارف پزشکی، صنایع آرایشی و بهداشتی و نیز صنایع غذایی دارد، بسیار مورد توجه است. کاربرد این گیاه داروئی در تولید مواد آرایشی، بهداشتی و غذائی در جهان گسترش یافته است، بنابراین استفاده از تکنیک‌های اصلاحی در اصلاح گیاهان دارویی و بهبود کمیت و کیفیت ویژگی‌های گیاهی مواد موثره مهم موجود در آنها (امیدبیگی، ۱۳۷۹) جهت تولید گیاهان دارویی پربازده امری ضروری است. با توجه به منافع اقتصادی و زیست محیطی و نیز به علت استفاده شدید از منابع مرتعی و جنگلی و محدودیت در کشت زراعی و به دلیل اینکه لازمهٔ استفاده از شیوه‌های اصلاحی بهینه سازی مسیرهای مقدماتی اصلاح یک گیاه دارویی است تا بتوان از شیوه‌های اصلاح و کشاورزی مولکولی جهت دستیابی بهینه به مواد موثره و درنتیجه محصولات ثانویه گیاهان دارویی بهره جست، در این تحقیق به یافتن شیوه‌ای کم هزینه و اقتصادی و زودبازده جهت القای کالوس در گیاه دارویی بادرنجبویه در شرایط *In vitro* پرداخته شده است، تا استفاده از روش‌های اصلاحی از جمله استفاده از تنوع سوماکلونال، پرتو دهی و جهش و تولید شیمر و پلی‌پلوئیدی، تولید و استخراج اسانس و همچنین اصلاح مولکولی امکان‌پذیر گردد. بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) گیاهی از خانواده نعناعیان و جنس *Melissa* می‌باشد. از این گیاه برای بیماری‌های متعددی استفاده شده که از جمله آنها می‌توان به برونشیت، آسم (Mamedov and Craker, 2001)، سرفه، تب، مشکلات قاعدگی، فشار خون، استرس، میگرن، شوک، سرگیجه (Lawless, 1992; Duke, 2002)، مسائل پوستی و اگزما (Lawless, 1992)، نقرس (Grieve, 1931)، نیش و گاز گرفتگی حشرات (Bown, 2006)، نیش مار و بیماری‌های پوستی (Duke, 2002) اشاره نمود. مطالعات بسیاری انجام شده که خاصیت ضد باکتری و ضد قارچی روغن فرار بادرنجبویه را گزارش نموده‌اند (Nascimento *et al.,* 2000; Mimica *et al.*, 2004; Araujo *et al.*, 2003). علاوه بر خاصیت ضدباکتری و خواب‌آوری، اسانس ملیس دارای خاصیت ضدویروسی نیز می‌باشد که این ویژگی ناشی از ترکیبات پلی‌فنولیک موجود در اسانس گیاه است (Morelli, 1977). جمعیت‌های گیاه بادرنجبویه در تمام کشورهای مدیترانه‌ای شامل سواحل ترکیه و جنوب آلپ و همچنین نواحی مختلف ایران دارای گسترش و پراکندگی می‌باشد. از میان زیرگونه‌های این جنس، فقط زیرگونه *Officinalis* دارای ارزش اقتصادی بوده و رایحه‌ای شبیه بوی لیموی تازه از خود متصاعد می‌کند (Sari and Ceylan, 2002; Bahtyarca Bagdat and Cosge, 2006). با توجه به کاربردهای فراوان این گیاه دارویی در صنایع و نیز با توجه به اهمیت اقتصادی این گیاه مهم دارویی در این تحقیق بررسی القای

www.SID.ir

کالوس در ریزنمونه‌های مختلف گیاه تحت شرایط متفاوت و در نتیجه یافتن بهترین تیمارهای القای کالوس در شرایط مختلف مورد نظر بوده‌است.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این آزمایش در سال ۱۳۸۹، بذور دو توده مختلف گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) شامل توده‌های کرج و اصفهان از بانک ژن موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شد. جهت بررسی جوانه‌زنی از محیط های کشت MS، 1/2 MS و 1/4 MS، و برای آزمایش القای کالوس از محیط کشت MS استفاده گردید. در تمام شرایط غلظت ساکارز مورد استفاده معادل ۳۰ گرم در لیتر، و غلظت آگار مورد استفاده معادل ۷/۵ گرم در لیتر بودند و pH محیط برای جوانه‌زنی معادل ۵/۶۴، و برای القای کالوس معادل ۵/۸ تنظیم شد. برای استریلیزاسیون بذور، غوطه‌ور سازی آنها در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد در در زیر هود لامینار انجام شد و پس از گذشت ۱۰ دقیقه، هیپوکلریت سدیم تخلیه و شستشوی بذور توسط آب مقطر استریل در چهار نوبت انجام شد که عبارت بود از یک پیش شستشوی ۱ دقیقه‌ای و سه نوبت شستشوهای ۵، ۱۰، و ۱۵ دقیقه‌ای با آب مقطر استریل. پس از این مرحله، بذور بر روی کاغذ صافی قرار داده شدند تا آب اضافی آنها گرفته و برای کشت آماده شوند. پس از کشت درب ظروف با پارافیلم پوشانده شده و در اتاقک رشد در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا با یافتن محیط مناسب جوانه‌زنی برای بذرهای این گیاه درشرایط *In vitro*، کشت گسترده آن برای تامین ریزنمونه انجام شود. برای آزمایش القای کالوس در گیاه دارویی بادرنجبویه، از آزمایش فاکتوریل در

قالب طرح کاملا تصادفی با فاکتورهای اکوتیپ (اصفهان و کرج)، منشأ ریزنمونه (برگ، دمبرگ و میانگره)، هورمون 2,4-D (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر)، هورمون BAP (۰، ۱ و ۲میلی‌گرم در لیتر) و شرایط روشنایی (نور و تاریکی) در سه تکرار استفاده شد. ریزنمونه‌های تهیه شده از گیاهان ۴۵ روزه رشد یافته در شرایط *In vitro* بر روی محیط-های کشت MS تحت تیمارهای مختلف تلقیح شدند. ظروف کشت حاوی ریزنمونه ها در اتاقک رشد در دمای درجه سانتی‌گراد در شرایط نور با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، نگهداری شدند. ظروف کشت مربوط به شرایط تاریکی بلافاصله پس از کشت با فویل آلومینیومی پوشیده شدند. پس از گذشت یک ماه از تلقیح ریزنمونه‌ها، صفات حجم و درصد تولید کالوس ثبت شد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج و بحث

جوانه‌زنی: براساس مشاهدات کیفی، جوانه‌زنی بذرهای گیاه دارویی بادرنجبویه روی محیط کشت 1/2MS مناسب‌تر بود، چنانکه هم تعداد بذور جوانه زده، هم زمان لازم برای جوانه‌زنی و هم توسعه گیاه در این محیط مناسب‌تر بوده‌اند. البته در محیط 1/4MS نیز سرعت و تعداد بذور جوانه زده بالا بود، اما گیاه حاصله کمی ضعیف بود. در این خصوص آنالیز کمی صورت نگرفت اما بر اساس مشاهدات، محیط کشت 1/2MS برای کشت بذر بسیار مناسب‌تر تشخیص داده شد. به نظر می‌رسد مقادیر بالای نمک در محیط کشت، جوانه‌زنی بذور این گیاه را محدود می‌کند که این امر با نتایج ارائه شده توسط ریز و همکاران (Reis *et al.,2008*) مطابقت داشت. در مقادیر پایین نمک‌های پر مصرف و کم مصرف، سمیت حاصل از حضور غلظت بالای نمک‌ها تعدیل شده و با توجه به بالاتر بودن نسبت آب به نمک تسریع در جوانه‌زنی را به‌دنبال داشت. در غلظت 1/4MS محدود بودن منابع غذایی و پایین بودن نسبت عناصر غذایی به آب، منجر به مصرف زودهنگام نمک‌ها شده و توسعه گیاه با مشکل مواجه می‌شد. در این میان غلظت 1/2MS به عنوان حد وسط این دو حالت پاسخ خوبی در جهت، هم جوانه-زنی، و هم رشد و توسعه گیاه به دنبال دارد.

القای کالوس: با توجه به اینکه داده‌های حاصل از نوع درصد و رتبه‌ای بودند بنابراین داده‌ها از توزیع کای اسکوئر به جای توزیع نرمال تبعیت می‌نمودند و نرمالیته داده‌ها برقرار نشد. در نتیجه با توجه به نرمال نبودن داده‌ها، برای آنالیز آنها از آزمون کروسکال والیس که معادل آزمون F (آنالیز واریانس) در توزیع‌های نرمال است، استفاده شد.

جدول شماره ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات

Table 1. Analysis of variance results for treats

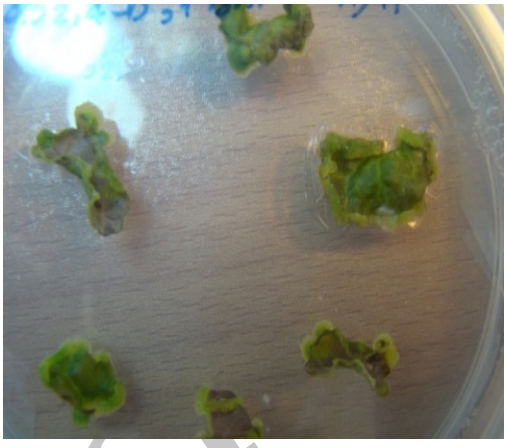
صفات treats	درجه آزادی Degree of freedom	آماره کای اسکوئر Chi-square statistic
درصد القای کالوس %Callus induction	64	158.514**
حجم کالوس Callus bulk	64	164.889**

با توجه به رتبه‌دهی حاصل از آزمون کروسکال والیس مشاهدات و نتایج مشاهدات عینی حاصل از آزمایش تایید گردید (جدول شماره ۲). با توجه به نتایج آماری حاصل از آزمون کراسکال والیس اکوتیپ کرج از لحاظ تولید کالوس ضعیف‌تر از اکوتیپ اصفهان عمل نمود. در خصوص ریزنمونه‌ها نتایج نشان داد که بسته به تیمار اعمال شده ریزنمونه-ها پاسخ‌های مختلفی را به دنبال دارند. نتایج آزمایش نشان داد که در تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، برای ریزنمونه برگ، القای کالوس از نواحی برش خورده آغاز شد و به سایر نواحی ریزنمونه سرایت نکرد و ملاحظه گردید که برش و زخم در ریزنمونه باعث تحریک تولید کالوس می‌گردد (شکل ۱). ضمنا با توجه به اینکه القای کالوس از نواحی برش خورده آغاز می‌شود (Schultz, *et al.,*

Archive of SID

www.SID.ir

1990)، بنابراین پیشنهاد می‌گردد که سطوح ریزنمونه‌ها قبل از تلقیح، زخمی شود.



شکل ۱- شروع کالوس‌دهی از نواحی برش خورده
Figure 1. Callus initiation from cutted places

ریزنمونه‌های برگ در تیمار هورمونی مذکور، در شرایط نور و تاریکی جهت آغاز کالوس‌دهی نیاز به ۸ روز زمان دارند. کالوس تشکیل شده در نواحی برش‌خورده در ریزنمونه‌هایی که در شرایط روشنایی قرار گرفته بودند، به رنگ سبز بلوری و از نوع گرانوله و ترد بوده‌اند، در حالیکه در مورد ریزنمونه‌هایی که در شرایط تاریکی قرار داشتند، رنگ کالوس به صورت شیری یا کرم رنگ دیده می‌شد (شکل ۳). چنانچه کالوس‌های تولید شده در شرایط تاریکی در معرض نور قرار می‌گرفتند، رنگ آنها به صورت سبز کدر درمی‌آمد. در تمام ریزنمونه‌های برگی تولید کالوس همراه با سیاه شدن ریزنمونه برگی بود (شکل ۲) که حتی بازکشت هم جلوی این تیره و سیاه شدن، و تخریب و خشک شدن بافت برگ را نمی‌گرفت، بنابراین برای جلوگیری از سرایت این فساد به کالوس، قسمت‌های مرده در هر بازکشت حذف می‌شدند. پس از بازکشت، توده سلولی کالوس برای استقرار روی محیط کشت جدید، مدتی حالت رکود در سرعت رشد را داشت که پس از این دوره کوتاه، شروع به رشد می‌نمود.

شکل ۲- القای کالوس از نواحی برش خورده ریزنمونه برگ و تخریب ریزنمونه (تیمار هورمونی۱ BAP + ۰/۵ 2,4-D)
Figure 2. Callus production from cutted site of leaf explants and explant degeneration (0.5 2,4-D + 1 BAP hormonal treatment)

حجم کالوس‌های تولید شده در تاریکی نسبت به روشنایی بیشتر بود. سیاه شدن و تخریب بافت ریزنمونه برگ در شرایط تاریکی بسیار با تاخیر اتفاق می‌افتاد، و بافت اصلی ریزنمونهٔ برگ، برخلاف حالت روشنایی مدت بیشتری سالم می‌ماند. استفاده از تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، برای برگ‌ها در شرایط تاریکی پس از مدت ۱۰ روز، تولید کالوس در نواحی برش خورده را به‌دنبال داشت. حجم کالوس تولیدی در مقایسه با مورد مشابهی که در شرایط روشنایی قرار داشت بیشتر بود، ضمن اینکه در شرایط روشنایی اکثر ریزنمونه‌های برگی از بین می‌رفتند و ندرتاً کالوس تشکیل می‌شد. کالوس‌های تولید شده در این تیمار در شرایط روشنایی، سبز کمرنگ و روشن

Archive of SID

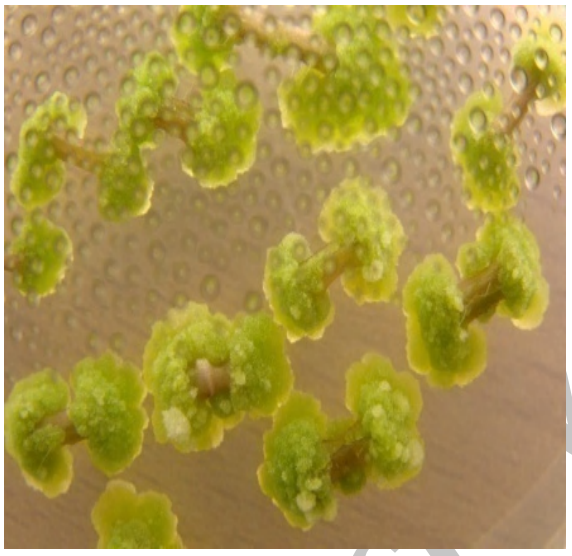
www.SID.ir

بودند. با اینکه معمولاً 2,4-D به عنوان قوی‌ترین اکسین مطرح است و مشخص شده است که استفاده از مقادیر بالای اکسین بزرگ شدن طولی سلول و افزایش تقسیم سلول را سبب می‌شود (شهادتی‌مقدم، ۱۳۸۰) اما در این تحقیق ملاحظه گردید که افزایش در غلظت این هورمون نه تنها افزایش تولید کالوس را به دنبال نداشت بلکه خود عاملی در جهت تخریب سریع ریزنمونه بود. که این امر مخالف با نتایج کومار و روپاواتی (Kumar and Rupavati, 2002) بود.

شکل ۳- القای کالوس در ریزنمونه برگ در شرایط تاریکی (تیمار هورمونی۱ BAP +۱ 2,4-D)

Figure 3. Callus induction in leaf explants in dark condition (1 2,4-D +1 BAP hormonal treatment)

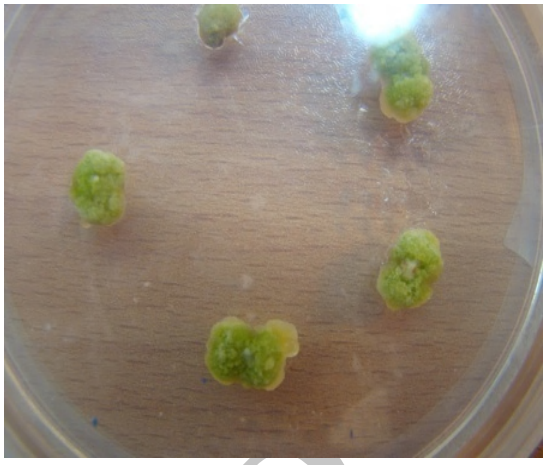
تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، تیمار بسیار مناسبی برای القای کالوس در ریزنمونه‌های دمبرگ (شکل ۵) و میانگره (شکل۴) در گیاه دارویی بادرنجبویه می‌باشد. حدود ۱۰ روز تا آغاز کالوس دهی زمان لازم است و در شرایط روشنایی کالوس‌هایی با حجم قابل توجه، سرعت تکثیر بالا و به حالت گرانوله و به رنگ سبز بلوری تشکیل می‌شود. شدت تکثیر کالوس به حدی است که پس از مدتی، بافت کالوسی، تمام ریزنمونه را دربر می‌گیرد. تحریک تولید و تکثیر کالوس، اگرچه در دو انتهای برش خوردهٔ ریزنمونه بیشتر است، اما در ابتدا در تمام بخش‌های ریزنمونه، باهم شروع می‌شود. بازکشت ریزنمونه‌ها سرعت تولید و تکثیر توهٔ سلولی کالوس را افزایش می‌دهد.



شکل ۴- القای کالوس در ریزنمونه دمبرگ در شرایط روشنایی (تیمار هورمونیBAP ۱ + 2,4-D ۱)

Figure 4. Callus induction from petiol explants in light condition (1 2,4-D +1 BAP hormonal treatment)

www.SID.ir



شکل ۵- القای کالوس در ریزنمونه میانگره در شرایط روشنایی (تیمار هورمونی۱ BAP + ۱ 2,4-D)

Figure 5. Callus induction from internode explants in light condition (1 2,4-D +1 BAP hormonal treatment)

در این آزمایش، اگرچه از تیمارهای متعددی برای القای کالوس استفاده شد، اما اکثر تیمارها هیچگونه کالوسی تولید نکردند به نحوی که در پایان دوره آزمایش با جمع آوری اطلاعات حاصل از آزمایش،

بدون توجه به این داده‌ها و با استفاده از مشاهدات عینی، بهترین تیمار که البته با راندمان بالایی عمل کرده بود کاملاً به وضوح قابل تشخیص بود، چنانکه مشاهده کالوس پرحجمِ گرانوله، ترد و به رنگ سبز بلوری و با سرعت تکثیر بالا، نشان می‌داد که بهترین تیمار برای تولید باکیفیت‌ترین کالوس که حجم قابل توجه و سرعت تکثیر مناسب داشته باشد، و ترد و گرانوله باشد مربوط به استفاده از تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، برای ریزنمونه میانگره و دمبرگ در شرایط روشنایی بوده‌است. پس از این تیمار، استفاده از ریزنمونه برگی با تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیترهورمون 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، در شرایط تاریکی و سپس نور، تیمار پر بازده‌ای می‌باشد. در آزمایشی که انجام شد مشخص گردید که القای کالوس در گیاه دارویی بادرنجبویه در تیمار هورمونی همزمان اکسین و سیتوکینین حاصل می‌شود و استفاده از تنها سیتوکینین یا اکسین نمی‌تواند در القای کالوس موثر باشد.

نتیجه‌گیری کلی

برای القای موثر کالوس در گیاه دارویی بادرنجبویه لازم است از تیمار همزمان اکسین و سیتوکینین استفاده گردد. بهترین تیمار مربوط به استفاده از تیمار هورمونی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، برای ریزنمونه میانگره و دمبرگ در شرایط روشنایی بود. همچنین استفاده از ریزنمونه برگی با تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیترهورمون 2,4-D به همراه ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP، در شرایط تاریکی و سپس نور، تیمار پربازده‌ای می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ۲- آزمون کراسکال والیس برای صفت‌های درصد القای کالوس و حجم کالوس
Table 2. Kruskal-Wallis test for callus induction and callus bulk

۷

ردیف	نور light	اکوتیپ Ecotype	ریز نمونه Explant	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	رتبه درصد القای کالوس %Callus induction rank	رتبه حجم کالوس Callus bulk rank
1	روشنایی light	اصفهان Isfahan	برگ leaf	0.5	1	162.5	161.33
2	روشنایی light	اصفهان Isfahan	دمبرگ petiol	1	1	162.5	167.5
3	روشنایی light	اصفهان Isfahan	میانگره internode	1	1	162.5	172.17
4	روشنایی light	اصفهان Isfahan	میانگره internode	1	1.5	134.17	159.5
5	تاریکی dark	اصفهان Isfahan	برگ leaf	0.5	1	162.5	179.33
6	تاریکی dark	اصفهان Isfahan	برگ leaf	1	1	162.5	155.17
7	تاریکی dark	اصفهان Isfahan	برگ leaf	1	2	147.17	137
8	تاریکی dark	اصفهان Isfahan	دمبرگ petiol	1	1.5	104.17	89.5
9	تاریکی dark	اصفهان Isfahan	میانگره internode	1	1.5	101	113.17
10	تاریکی dark	اصفهان Isfahan	میانگره internode	1	2	113.83	134.67
11	روشنایی light	کرج Karaj	برگ leaf	0.5	1	162.5	159.83
12	روشنایی light	کرج Karaj	برگ leaf	1	1	162.5	145.67
13	روشنایی light	کرج Karaj	دمبرگ petiol	1	1	162.5	158.67
14	روشنایی light	کرج Karaj	دمبرگ petiol	1	2	123.5	106
15	روشنایی light	کرج Karaj	دمبرگ petiol	2	2	113.83	110.67
16	روشنایی light	کرج Karaj	میانگره internode	1	1	162.5	173.17
17	روشنایی light	کرج Karaj	میانگره internode	1	1.5	123.83	138.5
18	تاریکی dark	کرج Karaj	برگ leaf	0.5	1	162.5	177.33
19	تاریکی dark	کرج Karaj	برگ leaf	1	1	154.83	146.33
20	تاریکی dark	کرج Karaj	برگ leaf	1	2	154.83	127.5
21	تاریکی dark	کرج Karaj	میانگره internode	1	1	18	111
22	تاریکی dark	کرج Karaj	میانگره internode	1	1.5	104.17	113.17
23	تاریکی dark	کرج Karaj	میانگره internode	1	2	113.83	128.17

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست منابع

Reference

امیدبیگی، ر. ۱۳۷۹، رهیافت های تولید و فرآوری گیاهان دارویی، انتشارات فکر روز، جلد سوم

شهادتی‌مقدم، ز. ۱۳۸۰. تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، سمینار کارشناسی ارشد، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه مازندران، ص۲

Araujo, C., M.J. Sousa , M. F. Ferreira , C. Leao, 2003. *Activity of essential oils from Mediterranean Lamiaceae species against food spoilage yeasts*. Journal of food protection 66(4):625-632.

Bahtyarca Bagdat, R. and B. Cosge, 2006. *The essential oil of lemon balm Melissa officinalis L., its components and using fields*. J. Fac. Agric, 21(1):116 -121.

Bown, D., 2006. *Personal communication*, December 8 and December 13.

Duke, J. A., 2002,*Handbook of medicinal herbs*, Boca Raton, FL: CRC Press.

Grieve, M., 1931. *A modern herbal: the medicinal, culinary, cosmetic and economic properties, cultivation and folk-lore of herbs, grasses, fungi, shrubs & trees with all their modern scientific uses*. New York: Harcourt, Brace & Company.

Kumar, O., and Rupavati, T., 2002. In vitro inductiom of callusogenesis inchilli peper (Capsicum annum L.), international journal of current reseaech, vol 3, pp:42-45

Lawless, J., 1992. *The encyclopedia of essential oils*, Shaftesbury, Dorset: Element Books.

Mamedov, N., and E. Lyle Craker, 2001. *Medicinal plants used for the treatment of bronchialasthma in Russia and Central Asia*, Journal of herbs, spices & medicinal plants 8(2/3):91-117.

Mimica, D. N., B. Bozin , M. Sokovic , N. Simin, 2004. *Antimicrobial and antioxidant activities of Melissa officinalis L. (Lamiaceae) essential oil*. Journal of agricultural and food chemistry. 52:2485-2489.

Morelli, I., 1997, *Constituents and use of Melissa officinalis*, Boll-chem- farm, Vol 116, P 334-40.

Archive of SID

www.SID.ir

Nascimento, G. G.F., L. Juliana; P. C. Freitas,G. L. Silva., 2000. *Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria*. Brazilian journal of microbiology. 31:247-256.

Reis, E. S., J. E. B. P., Pinto, L. D. S., Rosado and R. M., Correa., 2008. *Influence of culture medium on In vitro seed germination and multiplication rate of Melissa officinalis L.*, Revista ceres. 55(3): 160-167.

Sari, A. O., A. Ceylan., 2002.*Yield characteristic and oil composition of lemon balm (Melissa officinalis L.) grown in the Aegean region of Turkey*, Turk J. Agric for. 26-217:224.

Schultz W. Hose S., R. A. AbonMandou and F. C. Czygan, 1990. *Melissa officinalis L. (Lemon balm), Invitro culture and the production and analysis of volatile compounds*, Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 24, PP. 242

Archive of SID

www.SID.ir