

## تأثير حامض الفينيل الانين في امكانية زيادة حامض الروزمارنك وبعض المركبات الفينولية لنبات بلسم الليمون *Melissa officinalis* خارج الجسم الحي

ميساء حامد احمد  
جامعة النهدين/ كلية العلوم

لمياء خليفة جواد  
جامعة بغداد/ كلية الزراعة

### الخلاصة :

نفذ هذا البحث في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم البستنة - كلية الزراعة - جامعة بغداد، وقد هدف إلى توظيف تقنية زراعة الانسجة النباتية في امكانية زيادة بعض المركبات الفينولية (Rosmarinic acid، Caffeic acid، Coumaric acid، Hesperitin) لنبات بلسم أو عشبة الليمون أو الترناجان *Melissa officinalis* L. عن طريق تعريض النموات الخضرية الناشئة من مرحلة التضاعف الى مستويات مختلفة من الحامض الاميني Phenylalanine الباديء الاولي لحامض الروزمارنك والكثير من المركبات الثانوية الاخرى، تم زراعة العقد الجانبية على وسط MS المجهز بـ 2 ملغم.لتر<sup>-1</sup> من الـ BA بالتداخل مع 0.2 ملغم.لتر<sup>-1</sup> من الـ NAA. تم تعريض الانسجة المتخصصة الى مستويات مختلفة من الحامض الاميني فنيل الانين (0، 2.5، 5، 10 و 15) ملغم.لتر<sup>-1</sup> كونه الباديء الاولي لمركب الـ Rosmarinic acid والكثير من المركبات الثانوية الأخرى، تفوق الوسط الغذائي المجهز بـ 5 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من Phenylalanine معنوياً في اعطاء اعلى معدل من الوزن الطري للنموات الخضرية بلغ 3688 ملغم. وبينت النتائج الزيادة المعنوية في كمية حامض الروزمارنك مقارنة بمعاملة السيطرة (النمو الخضري المتضاعف تركيز 0 ملغم.لتر<sup>-1</sup> فنيل الانين) ومعاملة النمو الحقلي ولجميع مستويات المحفز الكيميائي الا ان المستوى الأعلى في انتاج مركب Rosmarinic acid كان في معاملة النموات الخضرية المتضاعفة والمزروعة على وسط MS المجهز بـ 5 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من الحامض الاميني Phenylalanine إذ وصل انتاج حامض الروزمارنك الى 477.0 مايكروغرام. غم<sup>-1</sup> مقارنةً مع 100.44 مايكروغرام. غم<sup>-1</sup> في النموات الخضرية النسيجية و 26.94 مايكروغرام. غم<sup>-1</sup> في النموات الخضرية الحقلية اي بنسبة زيادة وصلت الى اكثر من ثلاثة أضعاف في حالة النموات الخضرية النسيجية غير المعاملة والى حوالي سبعة عشر ضعفاً في حالة النموات الحقلية.

### EFFECT OF IN VITRO PHENYL ALANINE APPLICATION ON ROSMARINIC ACID AND OTHER PHENOLIC COMPOUNDS ACCUMULATION IN *Melissa officinalis*

#### Abstract :

The plant tissue culture lab, of Horticulture dept. Abo Ghareeb - College of Agriculture - University of Baghdad, have witnessed our research work, which aims to make use of in vitro culture technology to evaluate the ability of increasing some plant phenolic compounds (secondary products) like (Rosmarinic, Caffeic, Coumaric and Hesperitin) through expose the differentiated tissues (shoots) of Lemon Balm *Melissa officinalis* L. for a chemical phenylalanine elicitor. The in vitro multiplicities shoots which grown on MS media supplemented with 2 mg.L<sup>-1</sup> BA and 0.2 mg.L<sup>-1</sup> NAA where exposed to Different consecrations of phenylalanine 0.0,2.5,5,10 and 15 mg.L<sup>-1</sup>, the results indicate that the MS which supplemented with 5 mg.L<sup>-1</sup> Phenylalanine, give the significantly

highest fresh weight 3688 mg, the significantly highest rosmarinic acid 477.0  $\mu\text{g.g}^{-1}$  as compared with 100.44  $\mu\text{g.g}^{-1}$  on the in vitro shoots and 26.94  $\mu\text{g.g}^{-1}$  on the leaves from plant grown in green houses.

### المقدمة :

يعد بلسم الليمون *Melissa officinalis* أحد نباتات البحر الأبيض المتوسط وهو نبات عشبي معمر وأحد نباتات العائلة الشفوية Lamiaceae. يحتوي على الزيوت العطرية فضلاً عن المركبات الفينولية المهمة وقد اكتشفت أهميته الطبية لأول مرة على يد الأطباء العرب في القرنين العاشر والحادي عشر، إحدى مميزات هذا النبات أحتوائه على عطر الليمون كما يكثر استخدام أوراقه كشاي منعش وباعث على الهدوء يدعى أحياناً بمنشط الذاكرة ( 2002, Bown).

أدت التقانات الأحيائية المختلفة ولاسيما زراعة الأنسجة والأعضاء النباتية دوراً مهماً في البحوث التي حاولت الوصول الى مركبات مفيدة طبيياً، وعالمياً تستخدم النباتات في العالم مادةً خام لصناعة العقاقير والمستخلصات القيمة وهذا الموضوع ليس حديثاً وإنما بدأ مع بدء تعمق المعرفة بطريقة الزراعة خارج الجسم الحي الا ان الطلب المتزايد الذي تشهده الأسواق حالياً على المنتجات الطبيعية غير المصنعة هو الذي دعى الى إعادة التركيز على موضوع استخدام الأجزاء النباتية المكثرة خارج الجسم الحي كمصانع حيوية لإنتاج مركبات الأيض الثانوي ذات الاستخدام الطبي.

يعرف Harborne (1984) المركبات الفينولية بانها تمثل مدى واسعاً من المواد النباتية ذات الحلقة الاروماتية المفردة التي تحمل مجموعة او اكثر من مجاميع الهيدروكسيل وان المركبات الفينولية تميل لتكون مركبات ذائبة في الماء وغالباً ما توجد هذه المركبات في فجوة الخلية . ذكر كل من Dorman و آخرون (2003) و Dastmalchi و آخرون (2008) و Ondrejovic و آخرون (2012) و Mirona و آخرون (2013) و Ince و آخرون (2013)، بأن المواد الفينولية التي تم التعرف عليها وتشخيصها في مستخلص نبات بلسم الليمون هي...

Caffeic acid و Eridictyol-7-0-glucoside و m-Coumaric acid و Naringin و Hesperidin والـ Rosmarinic acid و Naringenin والـ Hesperetin

ذكر Ramawat و Merillon (2008) أن حامض الروزمارنك (-1-caffeyloxy- $\alpha$ ) المركب الرئيس المشترك بين اعضاء العائلة الشفوية (Lamiaceae) وعائلة لسان الثور (Boraginaceae) والعائلة الخيمية (Apiaceae) وعلى الرغم من ذلك فقد تم تشخيص 12 عائلة نباتية اخرى تحتوي على هذا المركب ذات النشاط الحيوي المهم كونه يحافظ على الاطعمة من التلف وذو فوائد طبية كمضاد للاكسدة والاحياء المجهرية.

بين Karam و آخرون (2003) ان اضافة Phenylalanine بتركيز 40 ملغم/لتر<sup>-1</sup> الى وسط المزارع الخلوية لنبات *Salvia fruticosa* حفزت انتاج مركب Rosmarinic acid مقارنة بالاوساط الغذائية غير المعاملة. كما أكد حمد (2011) ان اضافة الاحماض الامينية الى الوسط الغذائي خارج الجسم الحي لاتعمل كمركب بادىء فقط (precursors) بل كمحفز (Elicitor) أيضاً، اذ درس الباحث في تجربته على نبات ست الحسن *Atropa belladonna* تأثير اضافة الحامض الاميني Phenylalanine في انتاج قلويدات التروبان، وقد لخص الباحث نتائجه في استخدام الحامض الاميني Phenylalanine كمحفز بأن الوسط MS المجهز بتركيز 20 ملغم/ لتر<sup>-1</sup> من الحامض اعطى اعلى معدل للوزن الطري والجاف للكاس بلغ (584.2 و 48.84) ملغم على التتابع.

### مواد وطرائق العمل :

نفذ البحث في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم البستنة - كلية الزراعة - جامعة بغداد لفترة من ايلول 2012 ولغاية تشرين الثاني 2013 .

1- **قطعت النبيتات** بمعدل 2 سم وزراعتها على وسط MS الصلب والمجهز بـ 2 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من BA و 0.2 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من NAA و 30 غم. لتر<sup>-1</sup> سكروز. اضيف الحامض الاميني فنيل الانين بالتراكيز (0، 2.5، 5، 10، 15) ملغم. لتر<sup>-1</sup> حضنت الزروعات في غرفة النمو growth room على درجة حرارة 25± 2 م° واضاءة 1000 لوكس مدة 16 ساعة. يوم<sup>-1</sup> ضوء و8 ساعة ظلام، وبعد خمسة اسابيع تم حساب الوزن الرطب للنموات الخضرية.

## 2- الاستخلاص والتقدير الكمي والنوعي للمواد الفعالة

أخذ 1 غم من النموات الخضرية من الانسجة قبل وبعد التعريض للمحفز كذلك النموات الخضرية المأخوذة من البيت البلاستيكي التابع لوحدة النباتات الطبية، ذوبت العينات في محلول يحتوي 5 مل من الميثانول: ماء (60:40 حجم/حجم) ووضعت في جهاز الامواج فوق الصوتية ultrasonic bath لمدة 15 دقيقة ثم مرر المستخلص على disposable filter (mile poll) ذات مسامية 0.22 لتنقية المستخلص من الالياف والمواد غير الذائبة فيه، ثم وضع المستخلص في جهاز الطرد المركزي Centerfuge بسرعة 4500 دورة. ثانية<sup>-1</sup> لمدة عشر دقائق، ركز الراشح بواسطة تيار من النتروجين (Liquid nitrogen) ليصل الحجم اقل من 1 مل ثم اكمل الحجم الى 1مل بواسطة الطور السائل المستخدم للفصل إذ اصبح التركيز النهائي mg/ml = mg/g، سحب 20 ميكروليتر وحقن الى جهاز السائل كروموتوكرافي عالي الاداء HPLC وسحبت التراكيز مقارنة مع المادة القياسية stander تحت الظروف نفسها. حسب تركيز كل عينة باستخدام المعادلة الاتية :

### مساحة حزمة الأنموذج

$$\text{تركيز المجهول} = \frac{\text{X تركيز المحلول القياسي} \times \text{عدد مرات التخفيف}}{\text{مساحة حزمة المحلول القياسي}}$$

## 3- التحليل الاحصائي Statistical analysis :

نفذت التجارب باستخدام التصميم العشوائي الكامل (Completely Randomized Design) CRD وبعشرة مكررات وقورنت المتوسطات حسب اختبار اقل فرق معنوي LSD وعلى مستوى احتمال 0.05 (الساهاوكي ووهيب 1990).

### النتائج والمناقشة :

1- تأثير الحامض الاميني Phenylalanine في الوزن الطري (ملغم) للنموات الخضرية المتضاعفة. يوضح الجدول (1) تأثير التراكيز المختلفة من الحامض الاميني Phenylalanine في معدل الوزن الطري للنموات الخضرية النامية على وسط MS المجهز بـ 2 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من BA و 0.2 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من NAA اذ تفوق الوسط الغذائي المجهز بـ 5 و 10 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من Phenylalanine معنوياً في اعطاء اعلى معدل للوزن الطري للنموات الخضرية بلغ 3688 و 3578 ملغم على التوالي، في حين اعطت معاملة التركيز 15 ملغم. لتر<sup>-1</sup> اقل معدل للوزن الطري بلغ 2012 ملغم. قد يعود السبب في انخفاض الوزن الطري للنموات النسيجية عند التراكيز العالية من الحامض الاميني Phenylalanine الى حصول شد على النسيج والذي سبب سمية الخلايا (Matthews وآخرون، 1980 و Jacobsen، 1986).

جدول (1) تأثير الحامض الاميني Phenylalanine في الوزن الطري للنموات الخضرية المزروعة على وسط MS المجهز بـ 2 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من الـ BA و 0.2 من الـ NAA بعد 30 يوم من تاريخ الزراعة.

الوزن الطري (ملغم)	تراكيز Phenylalanine (ملغم. لتر <sup>-1</sup> )
3126	0.0
3247	2.5
3688	5
3578	10
2012	15
3130	المعدل
329.9	L.S.D 0.05

## 2- تأثير الحامض الاميني Phenylalanine في تحفيز المركبات الفينولية من النموات الخضرية

يوضح الجدول (2) ان لتراكيز الحامض الاميني Phenylalanine تأثيراً كبيراً في تحفيز المركبات الفينولية في النموات الخضرية المزروعة على وسط MS المجهز بـ 2 ملغم. لتر<sup>-1</sup> BA و 0.2 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من الـ NAA إذ أعطى الوسط الغذائي المجهز بـ 5 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من الحامض الاميني Phenylalanine اعلى معدل من مركب الـ Rosmarinic acid بلغ 476.99 ميكروغرام. غم<sup>-1</sup> وزن طري مقارنة بمعاملة السيطرة التي اعطت معدل 100.44 ميكروغرام. غم<sup>-1</sup> تحت ظروف التحضين نفسها وكما في الشكل (2)، إذ بلغت النسبة المئوية للزيادة 374.91 % أي ثلاثة اضعاف (جدول 3). في حين اعطت معاملة 10 ملغم. لتر<sup>-1</sup> بالـ Phenylalanine تركيز مركب الـ Rosmarinic acid بلغ 439.0 ميكروغرام. غم<sup>-1</sup> كما بالشكل (6) قد يعزى السبب في زيادة التقدير الكمي لمركب حامض الـ روزمارنك بزيادة الحامض الاميني فنيل الانين المضاف الى الوسط الغذائي بتركيز 5 الى كونه الباديء البنائي لحامض الـ روزمارنك Iliva و Pavlov (1999) و Khanna وآخرون، (2005)، كما يعد حامض الـ Rosmarinic مركباً دفاعياً ولهذا السبب فإن تعريضه للمحفزات وظروف الاجهاد يمكن ان تكون طريقة ناجحة لزيادة انتاج الاحماض الفينولية بضمنها حامض الـ روزمارنك في زراعة الانسجة النباتية (Kikowska وآخرون، 2012).

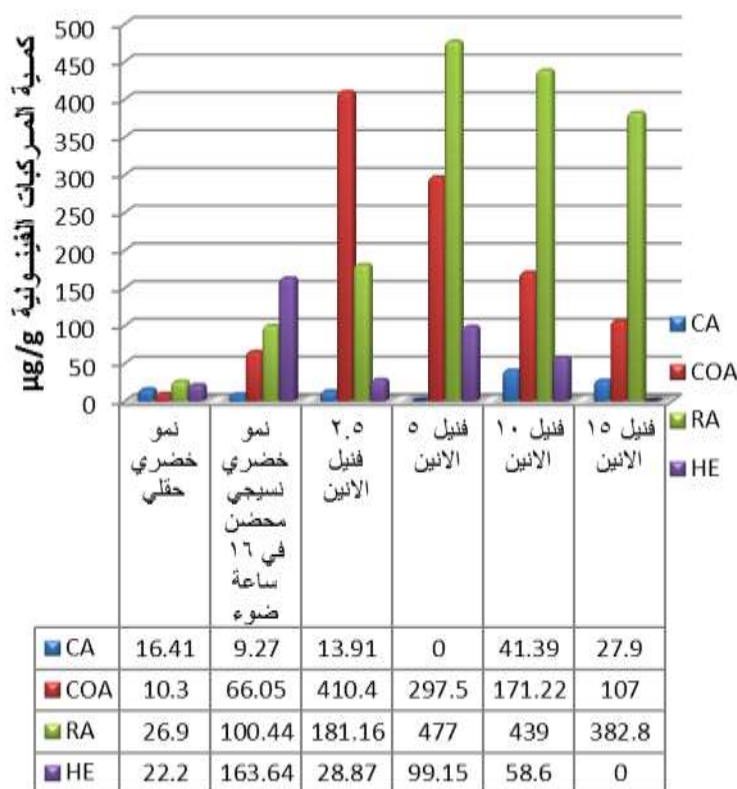
وبلغ اعلى تركيز لمركب الـ Caffeic acid عند معاملة 10 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من الفينيل الانين 41.39 مايكروغرام. غم<sup>-1</sup> وزن طري وبنسبة زيادة مئوية 346.49 % (جدول 3)، في حين لم يظهر وجود مركب الـ Caffeic acid في تركيز 5 ملغم. لتر<sup>-1</sup> شكل (5)، (6) وكان اقل تركيز لمركب الـ Caffeic acid 9.27 مايكروغرام. غم<sup>-1</sup> عند معاملة السيطرة شكل (2). وقد أعطت المعاملة 2.5 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من الفينيل الانين أعلى تركيز من المركب Coumaric acid بلغ 410.4 مايكروغرام. غم<sup>-1</sup> وسجلت تراكيز المركب ذاته اقل ما يمكن في معاملة السيطرة بلغ 66.05 مايكروغرام. غم<sup>-1</sup> بينما اعطت المعاملة 5 ملغم. لتر<sup>-1</sup> و 10 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من الـ Phenylalanine تركيز مركب Coumaric acid 297.5 مايكروغرام. غم<sup>-1</sup>، 171.22 مايكروغرام. غم<sup>-1</sup> على التوالي (جدول 2).

أما مركب الـ Hesperitin فيلاحظ ان معاملة 5 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من الحامض الاميني Phenylalanine قد اعطت تركيز مركب Hesperitin بلغ 99.15 مايكروغرام. غم<sup>-1</sup> في حين لم يظهر المركب بمعاملة 15 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من الفينيل الانين وكان تركيزه اقل في معاملة 2.5 ملغم. لتر<sup>-1</sup> من الفينيل الانين بلغ 28.87 مايكروغرام. وسجل مركب الـ Hesperitin تركيزاً بلغ 163.64 مايكروغرام. غم<sup>-1</sup> في معاملة السيطرة كما مبين بالشكل (1). قد يعود سبب قلة الاستجابة عند زيادة تراكيز الحامض الاميني Phenylalanine الى زيادة الجهد المسلط والذي اثر سلباً في تلك الخلايا مما سبب تلفها ومن ثم انخفاض فعالية الانزيمات المسؤولة عن تخليق الايض الثانوي (عبد القادر وآخرون، 1982). او قد يعود السبب الى ان زيادة الاجهاد قد تسببت في انخفاض قابلية الخلايا على امتصاص العناصر الغذائية

التي تحتاجها بكفاءة لانتاج مركبات الايض الاولي ومن ثم قلة في انتاج الايض الثانوي الذي يعد ناتجاً نهائياً للايض الاولي (ياسين، 1992).

جدول (2) تأثير تراكيز الـ Phenyl alanine في تحفيز المركبات الفينولية في النموات الخضرية نسيجياً

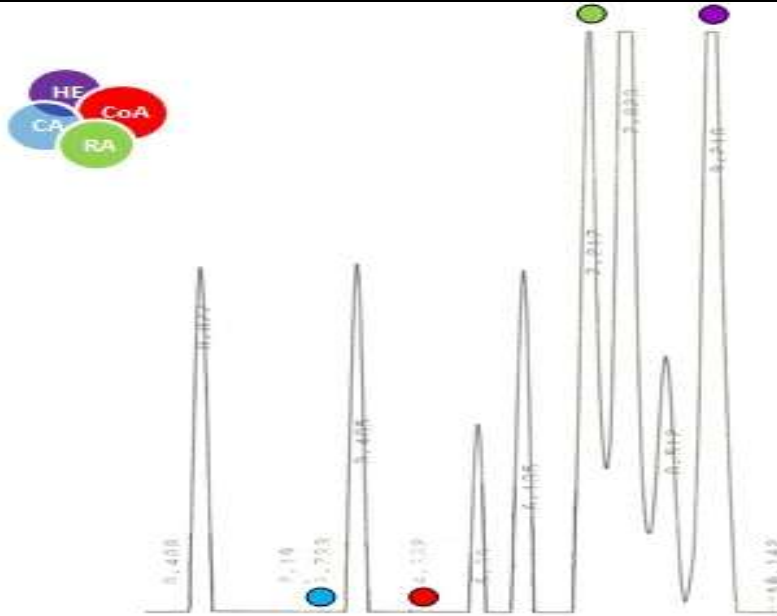
كمية المركبات الفينولية (مايكروغرام . غم <sup>-1</sup> )				تراكيز الـ Phenylalanine (ملغم. لتر <sup>-1</sup> )
Hesperitin	Rosmarinic acid	Coumaric acid	Caffeic acid	
163.64	100.44	66.05	9.27	0.0
28.87	181.16	410.4	13.91	2.5
99.15	477.0	297.5	-	5
58.60	439.0	171.22	41.39	10
-	382.8	107.0	27.9	15
22.2	26.9	10.3	16.41	نبات حقل
57.27	267.9	177.1	18.15	المعدلات
4.92	11.39	34.31	4.17	L.S.D 0.05



شكل (1) تأثير تراكيز الـ Phenyl alanine في تحفيز المركبات الفينولية في النموات الخضرية المتضاعفة نسيجياً

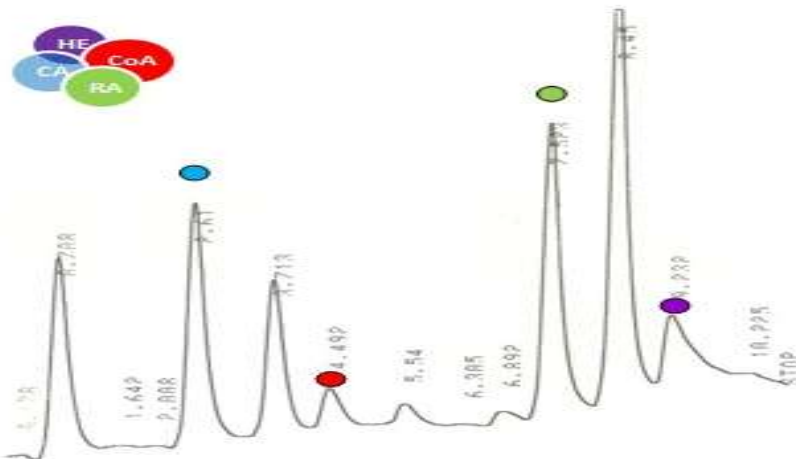
جدول (3) النسبة المئوية لزيادة ونقصان تراكيز المركبات الفينولية بعد اضافة الفينيل الانين بالمقارنة مع نبات الحقل

المركبات الفينولية	تركيز المركبات الفينولية % في النمو الخضري النسيجي المعرض لتراكيز مختلفة من الـ Phenylalanine (ملغم . لتر <sup>-1</sup> )			
	2.5	5	10	15
Caffeic	50.05	- 100	346.49	201
Coumaric	521.35	350.42	159.23	62.03
Rosmarinic	80.37	374.91	337.08	281.1
Hespertin	- 82.36	- 39.41	- 64.19	-100



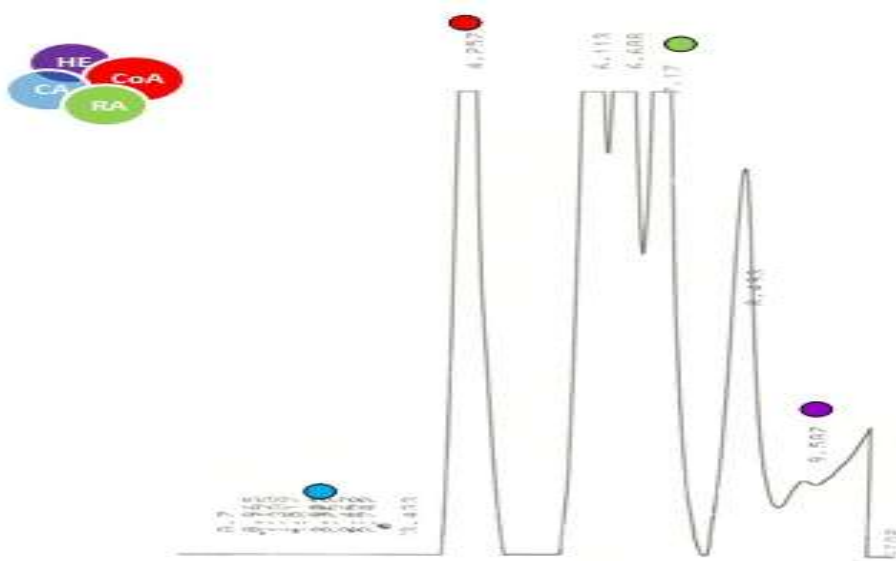
شكل (2) كمية بعض المركبات الفينولية في النموات الناتجة من المزارع النسيجية المحضنة في 16 ساعة ضوء و8 ظلام

Compound	Tim	Area	Conc µg/g
Caffeic acid	2.733	5000	9.27
Coumaric acid	4.302	14650	66.05
Rosmarinic acid	7.217	37148	100.44
Hespertin	9.218	42506	163.64

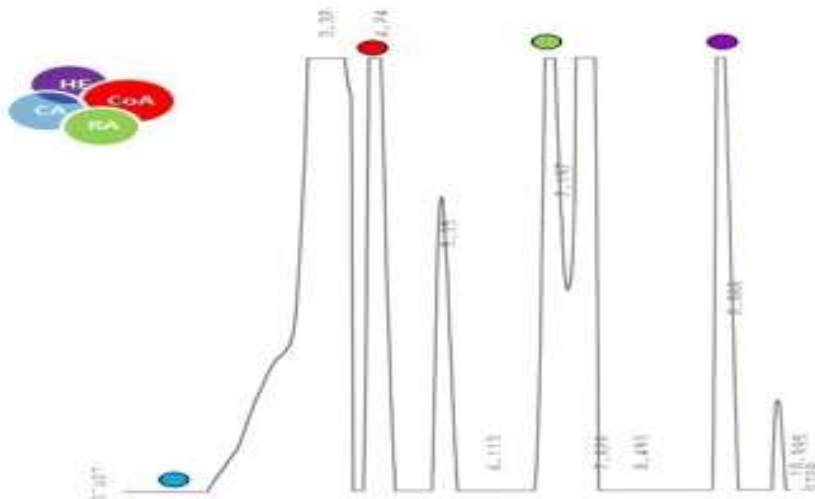


شكل (3) كمية بعض المركبات الفينولية في النباتات الحقلية

Compound	Tim	Area	Conc µg/g
Caffeic acid	2.61	17701	16.41
Coumaric acid	4.492	4563	10.28
Rosmarinic acid	7.523	19927	26.94
Hespertin	9.232	11547	22.23

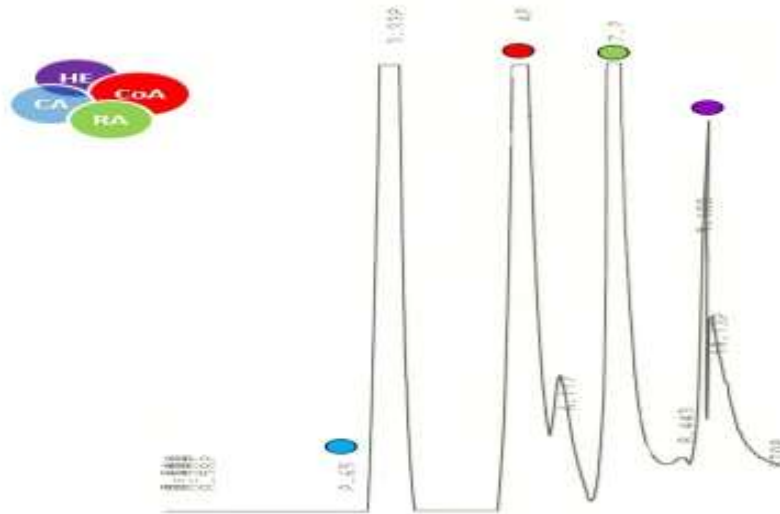
شكل (4) تأثير الفينيل الانين بتركيز 2.5 ملغم.لتر<sup>-1</sup> في انتاج المركبات الفينولية لنبات بلسم الليمون.

Compound	Tim	Area	Conc µg/g
Caffeic acid	2.742	5000	13.91
Coumaric acid	4.257	60672	410.35
Rosmarinic acid	7.17	44666	181.16
Hespertin	9.507	5000	28.87



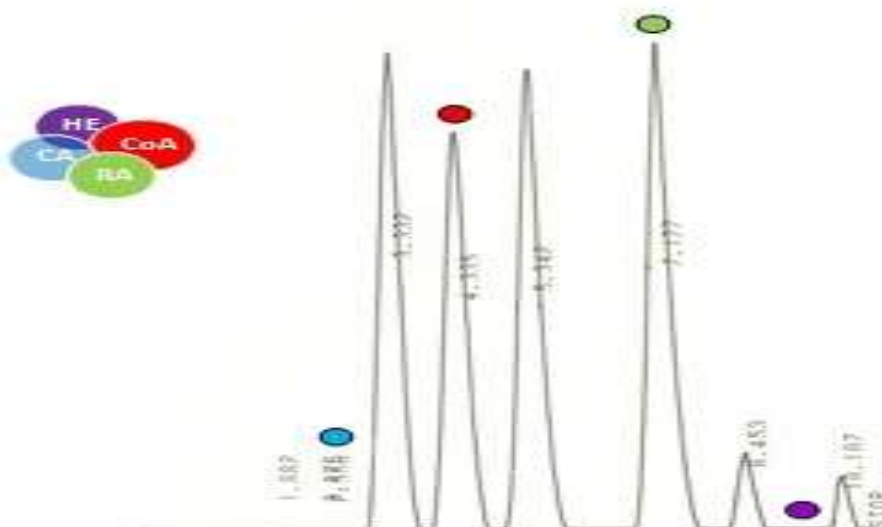
شكل (5) تأثير الفينيل الانين بتركيز 5 ملغم.لتر<sup>-1</sup> في انتاج المركبات الفينولية لنبات بلسم الليمون.

Compound	Tim	Area	Conc µg/g
Caffeic acid	0	0	0
Coumaric acid	4.24	43989	297.51
Rosmarinic acid	7.197	117601	476.99
Hespertin	9.183	17170	99.15



شكل (6) تأثير الفينيل الانين بتركيز 10 ملغم. لتر<sup>-1</sup> في انتاج المركبات الفينولية لنبات بلسم الليمون.

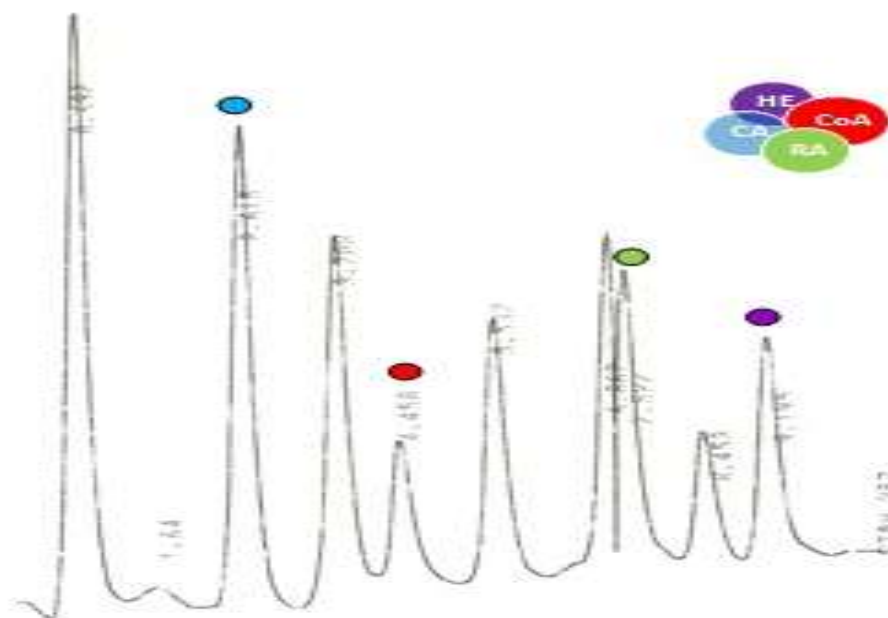
Compound	Tim	Area	Conc µg/g
Caffeic acid	2.65	6012	27.87
Coumaric acid	4.27	75947	171.22
Rosmarinic acid	7.2	64983	439.28
Hespertin	9.18	30444	58.60





شكل (7) تأثير الفينيل الانين بتركيز 15 ملغم. لتر<sup>-1</sup> في انتاج المركبات الفينولية لنبات بلسم الليمون.

Compound	Tim	Area	Conc µg/g
Caffeic acid	2.558	11158	41.39
Coumaric acid	4.335	9499	107.0
Rosmarinic acid	7.177	70783	382.79
Hesperitin	0	0	0



شكل (8) بعض المركبات الفينولية في المحلول القياسي لنبات بلسم الليمون

Compound	Tim	Area	Conc µg/g
Caffeic acid	2.615	26957	15.80
Coumaric acid	4.458	11089	6.50
Rosmarinic acid	7.527	18491	10.84
Hesperitin	9.195	12988	7.61

#### المصادر :

الساهوكي، مدحت و وهيب، كريمة محمد.(1990). تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب. جامعة بغداد. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، العراق.  
 حمد، محمد شهاب. 2011. تأثير حامض الساليسيلك والفينيل الانين في استحداث الكالس و انتاج قلويدات التروبان من نبات البالدونا *Atropa belladonna* خارج الجسم الحي، مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة. المجلد(3). العدد(2).ص170-185.  
 عبد القادر، فيصل و عبد اللطيف، فهمية و شوقي، احمد و ابو طيخ، عباس والخطيب، غسان.(1982). علم فسيولوجيا النبات . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق.

- ياسين، بسام طه (1992). فسلفة الشد المائي في النبات. جامعة الموصل - وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. العراق.
- Bown, D. (2002). New encyclopedia of herbs and their uses. Expanded edition, drooling Kindersley. London.
- Dastmalchi, K.; H. J. Dormana; P. P. Oinonen; Y. Darwis; I. Laakso and R. Hiltunen. (2008). Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. LWT 41: 391–400.
- Dorman, H. J. D. ; Bachmayer, O.; Kos-ar, M., and R. Hiltunen (2003). Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 4563–4569.
- Harborne, J.B. (1984). Phytochemical methods. Second edition, Chapman and Hall, New York, USA.
- Ince, A.E.; S. Sahin and S.G. Sumnu. (2013). Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound. Turk J Agric, 37: 69-75.
- Jacobsen, E. (1986). Isolation, characterization and regeneration of a S-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistant cell line of a dihaploid potato J. plant physiol., 123, 307-315.
- Karam, N. S.; F. M. Jawad; N. A. Arikat and R. A. shibli. (2003). Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root culture of wild *Salvia officinalis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 73: 117–121.
- Khanna, R.; A. K. Mathur and N. K. Mehrotra. (2005). Selection of 3- fluorotyrosine tolerant callus Lines in two culticars of opium Poppy (*Papaver somniferum* L. ), Vol. 88, No.1.
- Kikowska, M.; J. Budzianowski; A. Krawczyk and B. Thiem. (2012). Accumulation of rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids in *in vitro* cultures of *Eryngium planum* . Acta Physiol Plant, 34: 2425–2433.
- Mattews, B.F.; S.H. Shye and J.M. widholm. (1980). chanism of resistance of a selected carrot cell suspension culture to -(2-aminoethyle)-L-Cysteine. Z. Pflanzenphysiol., 96. 453-463.
- Mirona, T.L.; M. Herrero and E. Ibanez. (2013). Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. Journal of Chromatography A, 1288: 1- 9.
- Ondrejovic, M.; F. Kraic; H. B. vicova and S. Silhar. (2012). Optimisation of Antioxidant Extraction from Lemon Balm (*Melissa officinalis*). Czech J. Food Sci. Vol. 30, No.4: 385-393.
- Pavlov, A. and M. Iliva. (1999). The influence of phenylalanine on accumulation of rosmarinic and caffeic acid by *Lavandula vera* MM cell culture. World journal of microbiology and biotechnology 15: 397 – 399.
- Ramawat, K. G. and J. M. Merillon. (2008). Bioactive Molecules and Medicinal Plants. Springer-Verlag Berlin.