مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1391، دوره چهارم، شماره چهاردهم، صفحه52-47

بررسی مقایسه‌ای خواص ضد باکتریایی و ضد مخمری عصاره آبی و متانولی ریشه‌های مویین تراریخت ریشه‌های غیر تراریخت و اندام‌های هوایی برنجاسف (*Artemisia vulgaris*)

کاظم یاری زاده[1]، رامین حسینی[2]

1- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)

2- استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)

نویسنده مسؤول: دکتر رامین حسینی. دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره). raminh_2001@yahoo.com

دریافت: 91/7/15 پذیرش: 91/9/29

چکیده

زمینه و هدف: بیماری‌های عفونی از عوامل اصلی مرگ و میر در جهان هستند. با افزایش روز به روز مقاومت میکروب‌ها دربرابر آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض جانبی آنتی‌بیوتیک‌های ساختگی اهمیت شناسایی و توسعه آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی افزایش یافته است. ریشه مویین یک بافت غیرمعمول است که در اثر فعالیت باکتری *اگروباکتریوم رایزوجنز* ایجاد می‌شود. ریشه مویین به دلیل دو ویژگی مهم تولید متابولیت‌های معمولاً بیشتر و ساختن ترکیبات جدید نسبت به گیاه مادری می‌تواند گزینه مناسبی برای بررسی خواص ضدمیکروبی آن باشد. در این مطالعه به بررسی خواص ضدمیکروبی عصاره آبی و متانولی بافت‌های مختلف گیاه ***Artemisia vulgaris*** از جمله ریشه مویین آن در مقابل چهار نمونه باکتریایی و دو نمونه مخمری پرداخته شد.

روش بررسی: القای ریشه مویین از بافت برگ برنجاسف با استفاده از *آگروباکتریوم رایزوجنز* سویه **A4** انجام شد. آغازگر مربوط به ژن **rol b** طراحی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای بررسی تراریختی ریشه‌های مویین انجام شد. عصاره‌های آبی و متانولی ریشه‌های مویین، ریشه و اندام‌های هوایی تهیه و خواص ضد باکتریایی و ضد مخمری آن‌ها با استفاده از روش دیسک دیفیوژن بررسی شد.

یافته‌ها: در همه آزمایش‌ها، عصاره‌های آبی و متانولی ریشه‌های مویین اثرات ضد باکتریایی و ضد مخمری برجسته‌ای از خود نشان دادند. عصاره‌های بافت ریشه و اندام‌های هوایی اثر ضد میکروبی از خود نشان نداند. در همه موارد بجز *باسیلوس سابتیلیس* اثر ضد میکروبی عصاره آبی از عصاره متانولی ریشه‌های مویین بیشتر بود. در مورد *باسیلوس سابتیلیس* عصاره آبی و متانولی قطر هاله یکسانی ایجاد کردند. فعالیت ضد باکتریایی عصاره ریشه مویین بیشتر از اثر ضد مخمری آن بود.

نتیجه‌گیری: فعالیت ضد میکروبی ریشه‌های مویین و عدم این فعالیت در دیگر بخش‌های گیاه نشان می‌دهد که ریشه‌های مویین برنجاسف (***A. vulgaris***) ماده*ا*مواد ضد میکروبی تولید می‌کند که در دیگر بخش‌های گیاه تولید نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: عصاره متانولی، عصاره آبی، برنجاسف، ریشه مویین، فعالیت ضدمیکروبی

www.SID.ir

مقدمه

ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از معضلات مهم در کنترل شیوع بیماری‌های عفونی است. روز به روز مقاومت میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های موجود و سنتزی توجه زیادی را به توسعه و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های جدید و به ویژه آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی جلب کرده است (1). بنابراین به منظور دست‌یابی به مواد طبیعی ضد میکروبی غربالگری اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی توسط بسیاری از پژوهشگران مورد توجه قرار گرفته است (5-2). یکی از مزیت‌های مهم مواد ضد میکروبی طبیعی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی عوارض جانبی کمتر آن‌ها است.

گیاهان دارویی یکی از منابع مهم آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی به شمار می‌روند. *Artemisia vulgaris* که در ایران به برنجاسف معروف است، متعلق به خانواده *Asteraceae* و یک گیاه چند ساله است که 1 تا 2 متر رشد می‌کند. برنجاسف حاوی روغن‌های فرار، ترکیبات سزکویی‌ترپن لاکتونی و فلاونوئیدها است که به آن خاصیت حشره‌کشی، ضد میکروبی و ضد انگلی داده‌اند. در طب سنتی این گیاه به طور وسیع برای درمان دیابت، افسردگی، صرع، بی‌خوابی و اضطراب به کار می‌رود. همه بخش‌های گیاه از خواص کرم‌کشی، ضدعفونی‌کنندگی، ضد تشنج، ضد نفخ، مسهل صفرا، خلط‌آور، آرام‌بخش و مسهل برخوردار است (6).

ریشه‌های مویین تراریخت به واسطه فعالیت باکتری *اگروباکتریوم رایزوجنز* در نواحی آسیب دیده گیاه ایجاد می‌شود. ایجاد ریشه‌های مویین با انتقال بخشی از پلاسمید *Ri* *اگروباکتریوم رایزوجنز* حاوی ژن‌های *rolb, rolc, rola* به سلول‌های گیاه و ورود این ژن‌ها به ژنوم سلول‌های واقع در ناحیه آسیب دیده همراه است (11-7).

ریشه‌های مویین رشد سریعی دارند و در مدت زمان محدود زیست توده زیادی ایجاد می‌کنند. از جمله کاربردهای ریشه‌های مویین می‌توان به تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش، زیست‌پالایی مواد مضر از طبیعت، زیست‌تبدیل ترکیبات مهم و انتقال ژن اشاره کرد (12). استفاده از ریشه‌های مویین در زمینه تولید متابولیت‌های ثانویه یکی از مهمترین کاربردهای آن‌ها است، زیرا علاوه برخصوصیات گفته شده در بالا، توان تولید متابولیت‌های ثانویه توسط ریشه‌های مویین بیشتر از گیاه مادری است. در بسیاری از گیاهان از جمله *Beta vulgaris* (13)، *Salvia miltiorrhiza* (14)، *Gentiana macrophylla* (15)، از کشت ریشه‌های مویین برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه استفاده شده است. تاکنون علت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در بافت تراریخت ریشه مویین مشخص نشده است (16).

افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در بافت ریشه مویین نسبت به گیاه مادری امکان افزایش خواص ضد میکروبی و سایر خواص دارویی گیاهان دارویی را میسر کرده است. جاین و همکاران، (2007) نشان دادند که عصاره ریشه مویین گیاه *Mytenus senegalensis* خاصیت ضد باکتریایی بیشتری در مقابل *Staphilococcus aureus* نسبت به ریشه‌های عادی این گیاه دارد (16). یکی دیگر از خواص ریشه‌های مویین تولید ترکیبات جدیدی است که در گیاه مادری تولید نمی‌شود.

هدف از این مطالعه، بر اساس دو ویژگی مهم ریشه‌های مویین، یکی تولید متابولیت‌های ثانویه معمولاً بیش از بافت‌های عادی گیاه و دیگری تولید ترکیباتی جدید نسبت به گیاه مادری، بررسی خواص ضد باکتریایی و ضد مخمری ریشه‌های مویین *A. vulgaris* علاوه بر ریشه‌های عادی و اندام هوایی آن بود. القای ریشه مویین و بررسی خواص ضد باکتریایی و ضد مخمری عصاره آن برای اولین بار در این مطالعه صورت گرفت و مورد مشابهی تاکنون گزارش نشده است.

روش بررسی

بذرهای گیاه *Artemisia vulgaris* از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران و *اگروباکتریوم رایزوجنز* سویه A_4 از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک تهیه شد. نمونه‌های باکتریایی شامل *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa*، و نمونه‌های مخمری شامل *Candida albicans* و *Sacaromysis cervisiae* از آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) قزوین تهیه شد. دیسک‌های آنتی بیوگرام بلانک 6/4 میلی‌متری از شرکت پادتن طب، محیط کشت LB از شرکت High media و محیط کشت MS از شرکت Duchefa خریداری گردید.

ضد عفونی و کشت بذرها: قبل از ضد عفونی، جهت شکستن خواب بذرها، بذرها به مدت دو هفته در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ابتدا بذرها به مدت سه ثانیه در الکل 96 درصد غوطه‌ور و سپس با استفاده از آب مقطر استریل به مدت 5 دقیقه شست و شو شدند. پس از این به مدت 5

www.SID.ir

دقیقه با کلرید جیوه 0/1 درصد و متعاقباً سه مرتبه با آب مقطر استریل و هر مرتبه به مدت 5 دقیقه شست‌وشو شدند. بذرها پس از ضدعفونی در شیشه‌های مربای 280 میلی‌لیتری حاوی 25 میلی‌لیتر محیط MS جامد حاوی 3 درصد ساکارز کشت شدند. در هر شیشه 3 عدد بذر کشت داده شد. بذرهای کشت شده در اتاقک رشد با دوره نوری 8/16 روشنایی/تاریکی دمای 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

القا و کشت ریشه‌های مویین: کشت *اگروباکتریوم رایزوجنز* سویه A_4 در محیط LB مایع انجام شد. جهت القای ریشه مویین از برگ‌های جوان گیاهان یک ماهه استفاده شد. آلوده‌سازی بافت برگ به این ترتیب انجام شد که ابتدا روی سطح برگ زخم ایجاد شد و سپس نمونه‌های برگ به مدت 10 دقیقه در شرایط کاملاً استریل در کشت سوسپانسیون اگروباکتریوم غوطه‌ور شدند. پس از این مدت برگ‌های آلوده به محیط MS جامد حاوی 3 درصد ساکارز منتقل و در تاریکی در دمای $26^{\circ}C$ به مدت دو روز نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به محیط جدید حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (500 mg/l) منتقل شدند. انتقال نمونه‌ها به محیط جدید حاوی سفوتاکسیم هر هفت روز یک بار انجام شد تا زمانی که اثری از رشد باکتری‌ها مشاهده نشد. هنگامی که ریشه‌ها حدود دو سانتی‌متر طول داشتند به محیط 1/2MS مایع حاوی 3درصد ساکارز منتقل شدند.

بررسی تاریختی ریشه‌های مویین: استخراج DNA از بافت ریشه مویین با استفاده از روش C-TAB (17) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگر ژن *rol b* (F: 5'-AGGCGGCTGTTAGTGGACGC-3' R: 5'-GTCTCCCCTGGCCCGAGTGT-3') جهت تأیید تاریختی ریشه‌ها انجام گرفت. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر قابل برنامه‌ریزی (TECHNE) در 35 چرخه به صورت زیر انجام شد: مرحله واسرشت کننده در دمای 94°C به مدت 30 ثانیه، مرحله اتصال 58°C به مدت 1 دقیقه، همچنین مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای 94°C به مدت 3 دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای 72°C به مدت 10 دقیقه انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگاروز 1/2 % (w/v) بررسی شدند.

تهیه عصاره آبی و متانولی: نمونه برداری از اندام‌های هوایی و ریشه پس از شش ماه و ریشه‌های مویین پس از چهار ماه از کشت آن‌ها انجام شد. نمونه‌ها در تاریکی و دمای اتاق به مدت 48 ساعت خشک شدند. حدود 2 گرم از پودر هرکدام از بافت‌ها به یک بشر حاوی 100 میلی‌لیتر متانول 70 % منتقل شد. بشر مورد نظر در تاریکی روی شیکر با سرعت 70 دور در دقیقه به مدت 72 ساعت نگهداری شد. پس از این مدت با استفاده از کاغذ صافی عصاره متانولی صاف گردید و باقیمانده بافت‌ها دور ریخته شد. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه بن‌ماری تغلیظ و بدین ترتیب عصاره متانولی تهیه شد.

برای تهیه عصاره آبی حدود 2 گرم از پودر هرکدام از نمونه‌ها در 100 میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و به مدت 20 دقیقه در حمام آب گرم با دمای 60 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس نمونه‌ها به شیکر با سرعت 70 دور در دقیقه منتقل و بقیه مراحل مشابه تهیه عصاره متانولی انجام شد.

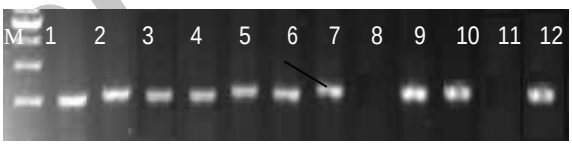
آزمون ضد باکتریایی و ضد مخمری به روش دیسک دیفیوژن: برای سنجش خاصیت ضد باکتریایی و ضد مخمری از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. برای این کار ابتدا سوسپانسیون هرکدام از نمونه‌های باکتریایی و مخمری با غلظت استاندارد 0/5 مک‌فارلند تهیه و روی محیط کشت لوریا بروث جامد با استفاده از سواپ به طور یکنواخت کشت شدند. دیسک‌های بلانک به مدت یک دقیقه در محلول عصاره‌ها (10mg/ml) غوطه‌ور و پس از خشک شدن حلال، روی محیط کشت قرار داده شدند. همچنین از دیسک‌های حاوی متانول به عنوان شاهد برای عصاره‌های متانولی و از دیسک‌های حاوی آب مقطر به عنوان شاهد برای عصاره‌های آبی استفاده شد. پلیت‌ها در دمای 37°C گرماگذاری شدند. پس از 18 ساعت از کشت، قطر هاله عدم رشد با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد.

یافته ها

القای ریشه مویین و بررسی تاریختی آن: نخستین ریشه‌های مویین حدود 12روز پس از اعمال آلودگی، پدیدار شدند. پس از حدود سه هفته، قطعات ریشه 2 سانتی‌متری جدا و به محیط MS ½ مایع منتقل شد (شکل1). به این ترتیب 10 لاین ریشه مویین ایجاد شد. از PCR برای بررسی تاریختی ریشه‌های مویین استفاده شد. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز نشان داد که تنها یک لاین (لاین 8) تاریخت نیست (شکل 2). از بین 9 لاین باقی‌مانده لاین 2 که بهترین شرایط رشد و کمترین تولید ترکیبات فنولی را داشت انتخاب و تکثیر شد.

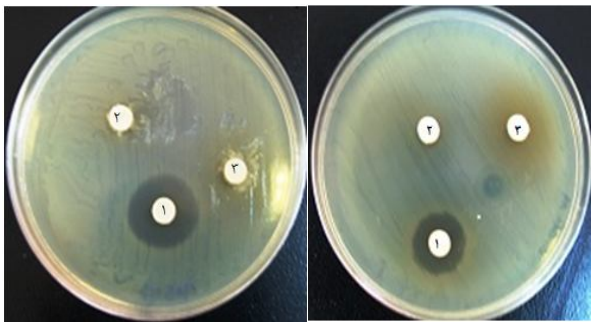
Archive of SID
www.SID.ir

شکل1. پدیدار شدن نخستن ریشه‌های مویین از بافت برگ درمحل زخم. نخستین ریشه‌های مویین حدود 12روز پس از اعمال آلودگی به وسیلهٔ *اگروباکتریوم رایزوجنز* پدیدار شد (a). پس از حدود سه هفته قطعات ریشه 2 سانتی‌متری جدا و به محیط ½ MS مایع منتقل شد (b).



شکل2. نتایج الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز. M نشانگر اندازه مولکولی، چاهک‌های10- 1 مربوط به لاین‌های ریشه، چاهک 11 کنترل منفی و چاهک 12، کنترل مثبت است. از 10 لاین ریشه‌های ایجاد شده تنها، لاین 8 باند نداده است. بنابراین لاین 8 غیر تراریخت است و ریشه مویین محسوب نمی شود.

بررسی خواص ضد میکروبی عصاره‌ها: اندازه‌گیری هاله عدم رشد نشان داد که در بین عصاره‌ها تنها، عصاره‌های آبی و متانولی ریشه‌های مویین اثر ضد میکروبی داشتند (شکل 3). عصاره‌های متانولی و آبی اندام‌های هوایی و ریشهٔ معمولی برنجاسف اثر ضد باکتریایی و ضد مخمری از خود نشان ندادند (جدول 1). دیسک‌های شاهد حاوی حلال هاله عدم رشد ایجاد نکردند. طبق نتایج، به غیر از *باسیلوس سابتیلیس*، در سایر موارد، عصاره آبی ریشه مویین اثر ضد باکتریایی بیشتری نسبت به عصاره متانولی از خود نشان داد. در ارتباط با اثر ضد مخمری نیز نتایج نشان دهنده اثر ضد مخمری بیشتر عصاره آبی نسبت به عصاره متانولی ریشه‌های مویین بود. به طور کلی اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی و آبی ریشه مویین بیشتر از اثر ضد مخمری آن‌ها بود. بیشترین تأثیر ضد میکروبی مربوط به عصاره آبی و متانولی ریشه مویین بر باکتری *باسیلوس سابتیلیس* با قطر هاله عدم رشد 21 میلی‌متر بود.



شکل 3. اثر مهاری عصاره آبی و متانولی ریشه مویین. اطراف دیسک حاوی عصاره متانولی (دیسک 1شکل1) و آبی (دیسک1 شکل2) بافت ریشه مویین بر محیط کشت *E. coli* هاله عدم رشد تشکیل شد اما در مورد عصاره بافت ریشه (دیسک 2) و اندام‌های هوایی (دیسک3) هاله عدم رشد مشاهده نشد. در سایر نمونه‌های باکتریایی و مخمری بررسی شده نتایج مشابهی مشاهده شد.

جدول 1: قطر هاله عدم رشد.

	عصاره متانولی			عصاره آبی		
	اندام‌های هوایی	ریشه	ریشه مویین	اندام‌های هوایی	ریشه	ریشه مویین
B. subtilis	-	-	21	-	-	21
S. aureuse	-	-	8	-	-	12
E. coli	-	-	18	-	-	20
P. aeroginosa	-	-	14	-	-	18
C. albicans	-	-	9	-	-	12
S. cerevisea	-	-	8	-	-	11

قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر آورده شده است. دیسک حاوی متانول و دیسک حاوی آب که به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفته بودند، هاله عدم رشد از خود نشان ندادند.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

عصاره‌های گیاهی از زمان‌های قدیم برای درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته شده‌اند. یکی از موارد مصرف عصاره‌های گیاهی استفاده در مقابل بیماری‌های عفونی است که توسط میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌شوند (18). متناسب با گونه گیاه یک، چند یا همه اندام‌های گیاه می‌توانند خاصیت ضد میکروبی داشته باشند (19). در این زمینه تا کنون گیاهان زیادی مطالعه شده‌اند (20). در بررسی و سنجش اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی در اکثر موارد از دو روش انتشار دیسک و ریز رقیق‌سازی استفاده می‌شود (22-21). دادگر و همکاران (2007)، اثر ضد باکتریایی 20 گونه از گیاهان دارویی از جمله گیاهان درمنه (*Artemisia herbaalba*) و افسنطین (*Artemisia absinthium*) را در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم و حساس به متیسیلین مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها دریافتند که از بین 20 گیاه مورد بررسی عصاره اتانولی 8 گیاه شامل اوکالیپتوس، اسپند، درمنه، سیاه دانه، زرشک، گل راعی، انار و گز در روش دیسک دیفیوژن بهترین اثر ضد *استافیلوکوکی* را با توجه به قطر هاله عدم رشد نشان دادند، به طوریکه حداکثر میانگین قطر هاله عدم رشد آن‌ها 22/4 میلی‌متر ارزیابی شد (23). مطالعه نخعی مقدم و همکاران (2006)، در ارتباط با اثر ضد هلیکوباکتر پیلوری عصاره آبی و متانولی زیره سبز و ترخون (*Artemisia dracunculus*) نشان داد که عصاره آبی و متانولی ترخون و زیره سبز رشد این باکتری را مهار می‌کنند(24). الیویرا و همکاران (2011)، اثر ضد باکتریایی عصاره آبی برگ گیاه *Moringa oleifera* را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که بهترین کارایی را در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و *انتروکوکوس فیکالیس*، دیسک‌های حاوی 400 میکرولیتر عصاره برگ دارد (25). کاستا و همکاران (2003)، اثر عصاره ریزوم برنجاسف را بر نماتود *Meloidogyne megedora* مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره ریزوم با غلظت 25 میلی‌گرم/میلی‌لیتر به نحو مؤثری باعث کاهش زنده‌مانی این نماتود تا 70 درصد می‌شود(26). مطالعات کمی در زمینه اثرات ضد میکروبی ریشه‌های مویین گیاهان دارویی صورت گرفته است. جاین و همکاران (2008)، فعالیت ضد باکتریایی ریشه‌های مویین گیاه *Maytenus senegalensis* را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که القای ریشه مویین، خواص ضد باکتریایی *M. senegalensis* را افزایش می‌دهد (16). این مطالعه اولین مورد القا و بررسی خواص ضد باکتریایی و ضد مخمری عصاره ریشه مویین گیاه برنجاسف است. به نظر می‌رسد که همانگونه که تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین معمولاً بیشتر از بافت اصلی گیاه مادری است، تولید ترکیبات ضد میکروبی و خواص ضد میکروبی نیز با القای ریشه‌های مویین افزایش یابد. به نظر می‌رسد اثر ضد باکتری و ضد مخمری بیشتر عصاره ریشه مویین برنجاسف نسبت به دیگر بافت‌ها مربوط به تراریخت بودن آن‌ها باشد. دیگر ویژگی ریشه‌های مویین تولید ترکیبات جدیدی است که در بافت‌های مربوط به گیاه مادری تولید نمی‌شود. بنابراین، دلیل دیگر نتایج بدست آمده در این مطالعه می‌تواند تولید ترکیبات جدید با خاصیت ضدمیکروبی باشد. تأیید این مطلب نیاز به بررسی مقایسه‌ای اجزای شیمیایی عصاره بافت ریشه مویین با سایر بافت‌ها با استفاده از روش‌های آنالیزی شیمیایی دارد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره آبی و متانولی ریشه‌های مویین گیاه برنجاسف خواص ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای دارند. عصاره آبی و متانولی اندام‌های هوایی و ریشه غیر تراریخت برنجاسف اثر ضد باکتریایی و ضد مخمری از خود نشان ندادند. به غیر از *باسیلوس سابتیلیس*، در سایر موارد، عصاره آبی ریشه مویین اثر ضد باکتریایی بیشتری نسب به عصاره متانولی از خود نشان داد. در ارتباط با اثر ضد مخمری نیز نتایج نشان دهنده اثر ضد مخمری بیشتر عصاره آبی نسبت به عصاره متانولی ریشه‌های مویین بود.

References

1. Jalali M, Abedi D, Asghari Gh, Rezaei Z. *Antimicrobial effect of divers extract of Pycnocycla spinosa fruit.* Mazandaran Medicinal Sci Uni. 2010; 17: 76-86.
2. Burt S. *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review.* Int. J. Food. Microbiol. 2004; 94: 223-253.
3. Ayfer D, Turgay O. *Antimicrobil activities of various medicinal and commercial plant extracts.* Turk. J. Biol. 2003; 27: 157-162.
4. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts.* J. Appl. Microbiol. 1996; 86: 985-990
5. Sonboli A, Azzizin D, Yousefzadi M, Kanani, Mehrabian AR. *Volatile constituents and antimicrobial activity of Tetrataenium lasiopetalum*

Archive of SID
www.SID.ir

(*Apiaceae) from Iran*. Flavour. Frag. J. 2007; 22:119-122.
6. Kumar SP, Kumari BDR. *in vitro and in vivo identification of variation in protein expression in Artemisia vulgaris.* Adv Biol Res. 2009; 3: 237-241
7. Karmarkar SH, Keshavachandran R. *Genetic transformation and hairy root induction in Holostmma adakodien K. Schuma vulnerable medicinal plant*. Indian J Exp Biol. 2001; 39: 1263-1267
8. Fu CX, Xu YJ, Zhao DX, Ma FS. *A comparison between hairy root cultures and wild plants of Saussurea involucrata in phenylpropanoids production.* Plant Cell Reports. 2006; 24: 750−754.
9. Kuz´ma Ł, Roz˙ alski M, Walencka W, Roz˙ alska B, Wysokin´ ska H. *Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of Salvia sclarea L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci*. Phytomed. 2007; 14: 31–5.
10. Kuz´ma Ł, Skrzypek Z, Wysokin´ ska H. *Diterpenoids and triterpenoids in hairy roots of Salvia sclarea*. Plant Cell Tiss Org Cult. 2006; 84:171–9.
11. Pavlov A, Georgiev V, Ilieva M. *Betalain biosynthesis by red beet (Beta vulgaris L.) hairy root culture*. Process Biochem. 2005; 40:1531–1533
12. Guillon S, Jocelyne G, Kumar Pati P, Rideau M, Gantet P. *Hairy root research: recent scenario and exciting prospects*. Curr Opinion Plant Biol. 2006; 9: 341-346
13. Pavlov A, Georgiev V, Ilieva M. *Betalain biosynthesis by red beet (Beta vulgaris L.) hairy root culture*. Process Biochem. 2005; 40: 1531–1533.
14. Yan Q, Hu Z, Xiang TR, Wu J. *Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in Salvia miltiorrhiza hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semi-continuous operation.* J Biotech. 2005; 119: 416–424.
15. Tiwari RK, Trivedi M, Guang ZC, Guo GQ, Zheng GC. *Genetic transformation of Gentiana macrophylla with Agrobacterium rhizogenes: growth and productionof secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures.* Plant Cell Rep. 2007; 26:199–210
16. Jain N, Light ME, Van Staden J. *Antibacterial activity of hairy-root cultures of Maytenus senegalensis.* South African J Bot. 2008; 74: 163–166
17. Heidari Japelaghi R, Haddad R, Garoosi GH. *Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides.* Mol Biotechnol. 2011; 49: 129–137
18. Basim H, Yegen O and Zeller W. *Antibacterial effect of essential oil of Thymbra spicata L. var. spicata on some plant pathogenic bacteria*. J. Plant Dis. Prot. 2000; 107: 279 - 84.
19. Maiti D, Kole C, Sen R. *Antimicrobial efficiency of some essential oils*. J. Plant Dis Prot.1985; 92: 64 -8.
20. Verdian-rizi M. *Essential oil composition and biological activity of Ziziphora clinopodioides from Iran.* Ame. Eu. J. Sus. Agri. 2008; 2: 69 - 71.
21. Bala M, Ray K, Gupta SM. *Comparison of disc diffusion results with minimum inhibitory concentration (MIC) values for antimicrobial* susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. *Indian J Med Res*. 2005; 122: 48-51.
22. Haug T, Kjuul AK, Styrvold OB, Sandsdalen E, Olsen QM, Stensvåg K. *Antibacterial activity in Strongylocentrotus droebachiensis (Echinoidea), Cucumaria frondosa (Holothuroidea), and Asterias rubens (Asteroidea).* J Invertebr Pathol. 2002; 8: 1 94-102.
23. Dadgar T, Ghaemi E, Bazoori M, Asemar M, Mazandarani M, siefi A, Bayat H. *Antibacterial effect of 20 medicinal plants against Staphylococcus aureus.* Gorgan Medicinal Sci Uni J. 2007; 9: 55-62
24. Nakhaei MM, Ramezani M, Khaje KAM, Malekzade F. *Anti helicobacter pylori effect of metanolic and aquoeus extracts of Cuminum cyminum and Artemisia dracunculus.* Iran Medicinal Basic Sci J. 2006; 9: 193-200.
25. Oliveira JR, Silva GC, Costa RA. *In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic Moringa leaf extracts.* Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2011; 26: 201-204.
26. Costa S, Santos MSN, Rayan MF. *Effect of Artemisia vulgaris rhizome extracts on hatching, mortality, and plant infectivity of Meloidogyne megadora.* J Nematol. 2003; 35: 437–442.

Archive of SID

www.SID.ir