توصيف مستخلص أوراق نبات الآس (*Myrtus communis* L.) ودراسة تأثيراته في DNAالفئران السويسرية البيضاء

د. علي حمود السعدي د. حسن فاضل ناجي
قسم علوم الحياة، كلية العلوم ، جامعة بابل

د. ستار جاسم حتروش م.م ياسمين خضير خلف
قسم علوم الحياة، كلية التربية ، جامعة كربلاء

الخلاصـــة

أختبرت الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي (**20 : 80** ، **v/v**) لأوراق نبات الآس **(Myrtus communis L.)** باستخدام نظامي الرش بالبيتاكاروتين ، والاكسدة الاقترانية للبيتاكاروتين وحامض اللينوليك . أنجز التحليل الوراثي أعتمادا" على فحص تحلل **DNA** لخلايا الدم البيضاء للفئران السويسرية البيضاء**(Balb/c)** بعد معاملتها بالمستخلص بتراكيز 0.001 ، 0.005 ، 0.01 ملغم/ 100 مايكروليتر من الراسب الخلوي . برزت الفعالية المضادة للأكسدة في مستخلص أوراق نبات الآس من خلال ظهور ثلاث حزم موجبة على كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة احتفظت باللون الاصفر للبيتاكاروتين (عامل الاعاقة = 0.87 ، 0.97 ، 0.98). وقد أكدت هذه الفعالية من خلال قدرة المستخلص على ابقاء مستوى الامتصاصية مستقرة نسبياً (**λmax = 470nm**) حتى الدقيقة105 من الوقت ومقاربة الى منحنى السيطرة الموجبة لل **Butylated hydroxy toluene** . أشارت نتائج التحليل الوراثي الى أن التركيز 0.001 ملغم / 100 مايكروليتر من الراسب الخلوي لم يسبب أي أضرار في **DNA** لخلايا الدم البيضاء للفئران ، في حين ادت المعاملة بالتركيزين 0.005 و 0.01 ملغم / 100 مايكروليتر الى حدوث تحلل واضح في **DNA** ، تمثل بظهور مسح بحجم جزيئي تراوح بين 20 – 2 و 18 – 0.4 كيلو زوج قاعدي على التوالي .

Abstract

The antioxidant activity of methanol water extract (20:80, v/v) of the leaves of Myrtus communis L. was checked, using the β - carotene spray method, and measuring the coupled oxidation of β - carotene and linoleic acid. The genetic analysis was carried out depending on DNA fragmentation test of WBCS of albino swiss mice (Balb/c) after exposuring to the extract of the concentrations 0.001 , 0.005 and 0.01 mg/100μl of cell pellet. The results showed that there is activity of the antioxidant in the extract through the appearance of 3 positive bands on thin layer chromatography, that kept the yellow colour of β - carotene (Rf=0.87. 0.97 and 0.98). This activity was confirmed by the ability of the extract to keep the absorbance relatively stable(λmax=470nm) through the period of 105 min. and close to the positive control curve of butylated hydroxy toluene **.** The genetic analysis results showed that the concentration of 0.001 mg/ 100μl of cell pellet was ineffective on the DNA of WBCS of mice, while the concentrations of 0.005 and 0.01 mg/100μl caused DNA fragmentation , these were cleared from the appearance of DNA smears with molecular sizes ranged between 20-2 and 18-0.4 kbp, respectively.

Keywords: Antioxidant activity, DNA fragmentation, Myrtus communis L.

المقدمة Introduction

ينتمي نبات الآس **Myrtus communis L.** الى العائلة الآسية **Myrtaceae** ، وهو عبارة عن شجيرات معمرة دائمة الخضرة غالباً ما تنمو في الاماكن الرطبة والظليلة ، وللنبات افرع كثيرة تحمل اوراق متقاربة جلدية القوام تتراوح بين البيضية والمستطيلة ومستدقة القمم متكاملة الحواف ذات رائحة عطرية ، وتحمل الاغصان ازهاراً بيضاء الى زهرية (1). لقد بين (2) ان مستخلصات نبات الآس تمتلك فعالية عالية مضادة للاكسدة ، وفي دراسة اخرى(3) تمت مقارنة الفعالية المضادة للاكسدة لثلاثة مستخلصات لهذا النبات ، تبين بان اعلى فعالية كانت في المستخلصات الكحولية المائية ثم مستخلص خلات الاثيل ثم مستخلص المتبقي المائي . كما بين (4) ان المستخلص المائي والمستخلص الميثانولي ومستخلص خلات الاثيل تظهر فعالية مضادة للشقوق الحرة عند اجراء اختبار الـ**1- T-diphenyl – 2- picryi hadrazyl** ، أذ أن مستخلصات هذا النبات تحتوي على اكثر من 20 مركباً و تعطي فعالية عالية لمستخلصات النبات . كما قام (5) بعزل المادة المسماة **Trimeric phloroglucinol myrtus commulo – neA** وهي من مشتقات الـ **Silylated cyclized** بحيث اظهرت فعالية قوية جداً

ضد بعض انواع البكتريا الممرضة . وقد اختبرت 92 حالة من الحروق الملوثة ببكتريا **Pseudomonas aeruginosa** ، اذ استخدم فيها تراكيز مختلفة من المستخلصات المائية لنبات الآس بالمقارنة مع مضادات حياتية مستخدمة في علاج الحروق ، واوضحت النتائج بان مستخلصات النبات أعطى نتائج ممتازة في فعاليتها المضادة للبكتريا(6) . كماعزلت بعض مركبات **Phytothem agglutinins** من نبات الآس والتي استخدمت كعوامل مخفضة لارتفاع الدهون في المصل (7). وقد درس تاثير المستخلص الميثانولي المائي لنبات الآس المضاد لارتفاع السكر في الفئران التي استحث فيها مرض السكري بوساطة مادة **Streptozotocin** ، أذ لوحظ انخفاظاً واضحاً في مستوى الكلوكوز في الفئران الطبيعية(8) . وقد اشار (9) الى ان استخدام الزيوت الطيارة لهذا النبات يؤدي الى خفض مستوى الكلوكوز في الاشخاص المصابين بالسكر من النوع الثاني ، ولهذا يهيئ هذا النبات مجالاً واعداً في الاستخدامات الطبية المهمة والمتعددة . هدفت الدراسة الحالية الى فحص القابلية المضادة للاكسدة للمستخلص الايثانولي المائي لنبات الآس ودراسة تأثيراته في المادة الوراثية اعتمادا" على فحص تحلل **DNA** .

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1- تحضير المستخلص النباتي

استخدمت اوراق نبات الآس **Myrtus communis L.** لغرض تحضير المستخلص الايثانولي المائي حسب طريقة (10) مع بعض التحوير ، حيث جونست اوراق النبات الغضة بمعدل 1 حجم : 3 مل من محلول الاستخلاص (20 كحول اثيلي : 80 ماء مقطر ، **v / v**) بواسطة خلاط كهربائي ولمدة نصف ساعة ، وبعد ترشيح الخليط وزع الراشح على انابيب اختبار سعة 10 مل عرضت للطرد المركزي بسرعة 3500 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة . جمعت الطبقة الرائقة العليا وركزت باستخدام المبخر الدوار (اخذ منها 100 مايكروليتر لاغراض التوصيف باستخدام **TLC**) ، ثم وضعت في اطباق بتري في حاضنة عند درجة حرارة 60 مْ لمدة 6 ساعات للحصول على المستخلص الجاف .

2- توصيف المستلخص النباتي باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة(TLC)

اخذت كمية 100 مايكروليتر من المستخلص ووضعت في قاعدة صفيحة السليكا (20 × 20 سم ، **F254** ، 0.25 ملم ، **E Merck** ، **Armsradt** ، **Germany**) المنشطة في الفرن عند درجة حرارة 105 مْ لمدة 60 دقيقة . استخدم مزيج البنزين : خلات الاثيل (90 : 10 ، **v / v**) كطور سائل لفصل الحزم المكونة للمركبات ، واجريت عملية الفحص للحزم تحت الاشعة فوق البنفسجية بطول موجي 320 نانوميتر والضوء المرئي (11) ، اذ تم تحديد عامل الاعاقة **(Retardation Factor, Rf)** لتلك الحزم باستخدام المعادلة الاتية :

$$\text{عامل الاعاقة (Rf)} = \frac{\text{المسافة التي قطعتها الحزمة}}{\text{المسافة التي قطعها الطور السائل}}$$

3- اختبار الفعالية المضادة للاكسدة

أ . طريقة الرش بالبيتاكاروتين

اجريت عملية اختبار الفعالية المضادة للاكسدة على صفائح **TLC** باستخدام طريقة الرش بالبيتاكاروتين المشار اليها من قبل (12) ، حيث عرضت الصفائح الى الضوء المرئي حتى تم قصر لون الارضية (2-6 ساعة) ، اذ ان الحزم التي تحتفظ باللون الاصفر (بعد 6 ساعات) تمثل مكونات مضادة للاكسدة و تتناسب كثافتها اللونية مع الفعالية .

ب . طريقة قياس الاكسدة الاقترانية للبيتاكاروتين

حددت الفعالية المضادة للاكسدة طبقاً الى (13) ، حيث اذيب 1 ملغم من البيتاكاروتين في 10 مل من الكلوروفورم، وقطر في دورق زجاجي يحتوي على 20 ملغم من حامض اللينوليك و 200 ملغم من 40 – **Tween** تحت ظروف الغليان ، واضيف اليه 5 مل من الماء المقطر المؤكسج. اخذ من هذا المستحلب 5 مل واضيف اليه 0.2 مل من المستخلص النباتي تحت الاختبار (**1000 ppm**) ، كما تم تحضير العينتين القياسيتين ، السالبة المكونة من نفس الكمية السابقة من المستحلب مضافاً اليها 1 مل من الماء المقطر ، والموجبة المكونة من نفس الكمية السابقة ايضاً مضافاً اليها 1 مل من مركب (**1000 ppm**) **Butylated hydroxy toluene**. قرأت الامتصاصية كل 15 دقيقة حتى الدقيقة 105 (معدل القراءة لثلاثة مكررات) .

4- اختبار تحلل الـ DNA

طبق هذا الاختبار على الفئران السويسرية البيضاء (**Balb/c**) ، بأوزن تراوحت بين 23 – 27 غم حسب (14) مع اجراء بعض التحوير ، اذ جمع راسب خلايا الدم البيضاء لثلاث فئران ، ثم اخذ منه ما يقارب 300 مايكروليتر ووزع بالتساوي على ثلاث انابيب ابندورف (100 ميكروليتر / انبوبة) واكمل الحجم باستخدام داريء الفوسفات **(0.2 M Phosphate buffer , pH 7.2)** ، الحجم النهائي 1 مل / انبوبة ، عوملت الانبوبة الاولى بـ 0.001 ملغم من المستخلص (0.001 ملغم / 100 مايكروليتر من الخلايا) ، والثانية بـ 0.005 ملغم (0.005 ملغم / 100 مايكروليتر من الخلايا) ، والثالثة بـ 0.01 ملغم (0.01

ملغم/ 100 مايكروليتر من الخلايا) وتركت لمدة ثلاث ساعات ، ثم اجري استخلاص **DNA** من الخلايا و قورن بالـ **DNA** المستخلص من الحجم نفسه لحيوانات مجموعة السيطرة غير المعاملة (3 فئران) .

5- أستخلاص الـ DNA الكلي

أستخلص الـ **DNA** الكلي من خلايا الدم البيضاء بعد معاملة حيوانات التجربة بالتراكيز التدريجية من المستخلص وفق ماأشار اليه (15).

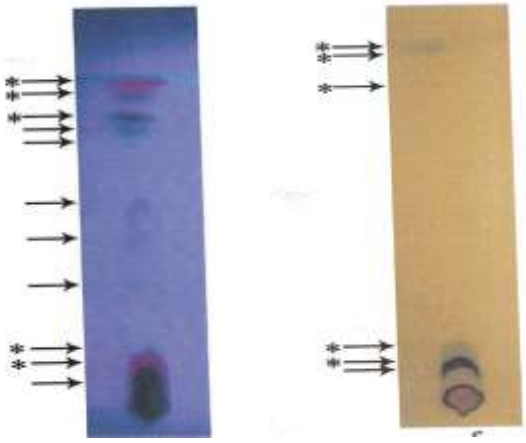
6- الترحيل الكهربائي

اجري الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز للـ **DNA** المستخلص من خلايا الدم البيضاء حسب ماذكر في (16).

النتائج والمناقشة Results and Discussion

يبين الجدول (1) الحزم المفصولة للمستخلص على صفائح **TLC** ، اذ يلاحظ عند الفحص تحت الضوء المرئي ظهور حزم تراوحت قيم **Rf** من خلايا الدم البيضاء لها بين **0.98** – **0.09** (شكل – 1) ، اذ يمكن ان يعزى ذلك الى احتواء مستخلص أوراق نبات الآس على اكثر من مكون ، خصوصاً وان مستخلصات هذا النبات وبالذات الكحولية المائية تحتوي على مركبات متنوعة ، مثل المركبات عديدة الفينولات **(Galloyl – glucoisides ellagitannins acid)، Flavonol glycosides** ، كما وتكون غنية بالتانينات فضلاً عن مشتقات **Galloyl** (3) . اشار (2) الى ان مستخلص نبات الآس يحتوي على مركب **Oligomeric non – prenylatedacylphloro glucinols** وقد اثبت (17) بان مستخلصات هذا النبات تحتوي على اكثر من 20 مركباً ، وعليه فان اجراء دراسة لاحقة تعتمد على كروموتوغرافيا الغاز المدمج بطيف الكتلة **(Gas chromatography- mass spectroscopy)** يمكن ان تعطي توصيف دقيق للمركبات المتواجدة في مستخلص النبات قيد الدراسة . يظهر الجدول (2) وجود فعالية جيدة مضادة للاكسدة للمستخلص الميثانولي المائي لنبات الآس ، وذلك من خلال احتفاظ 3 حزم باللون الاصفر للبيتاكاروتين من مجموع 11 حزمة ظهرت على صفائح **TLC** (شكل – 2) ، وقد عززت هذه النتيجة بالاختبار الثاني الذي تم بطريقة الاكسدة الاقترانية للبيتاكاروتين وحامض اللينوليك (شكل – 3). لوحظ أن قدرة المستخلص على جعل مستوى الامتصاصية مرتفع نسبياً (< 0.4) عند الطول الموجي 470 نانوميتر مقارنة بالسيطرة السالبة بحيث استقر هذا المستوى عند الدقيقة105 الامر الذي يؤكد فعالية وثباتية المستخلص كمضاد للاكسدة . ان هذه النتيجة تتفق مع ما اشار اليه (4) في كون المستخلص المائي والمستخلص الميثانولي ومستخلص خلات الاثيل لنبات الآس تظهر فعالية مضادة للشقوق الحرة عند اجراء اختبار **(2,2-diphenyl- 1- pierylhydrazyl)**، علاوة على قدرتها على تقليل بروكسيد الهيدروجين مقارنة مع مادتين قياسيتين مضادتين للاكسدة وهما **Butylated hydroxy anisole** و**Butylated hydroxy toluene** . ان النتيجة اعلاه تقترح استخدام مستخلصات أوراق هذا النبات كمضادات طبيعية للاكسدة في تطبيقات وقائية وعلاجية ، فضلاً عن إمكانية استخدامها في حفظ الاغذية بعد تعزيز ذلك بدراسات مكملة .

ان مستوى التحلل الحاصل في الـ **DNA** المستخلص من خلايا الدم البيضاء بعد المعاملة بتراكيز تدريجية من المستخلص يظهر في الجدول (3) والشكل (4) ، اذ يلاحظ بان التركيز الاول (0.001 / 100 مليكروليتر) ادى الى ظهور حزمة واحدة بحجم جزيئي تراوح بين 19 – 9 كيلو زوج قاعدي وهذا مقارب جداً للحجم الجزيئي لحزمة الـ **DNA** الممثلة لعينة السيطرة (20 – 11 كيلو زوج قاعدي) ، في حين ادت المعاملة بالتركيزين الثاني والثالث (0.005 و 0.01 ملغم / 100 مايكروليتر) الى تحلل واضح تراوح بين 20 – 2 و 18 – 0.4 كيلو زوج قاعدي على التوالي. ان هذه النتيجة تبين تأثر الـ **DNA** سلبياً بالتراكيز المرتفعة التي تصل الى 0.05 ملغم / 100 مايكروليتر من الخلايا ، وهذا يشير الى فعالية المستخلص المحللة للـ **DNA** والتي قد تكون بتأثيره على الأشرطة المفردة او المزدوجة . يتفق هذا ضمناً مع ما أشار اليه (18) من ناحية وجود تاثير سمي للزيوت الاساسية المستخلصة من اوراق نبات الآس ،أذ يحدث هذا اذا ما اعطي الزيت للفئران عن طريق الفم بجرعة 2.2 مل / كغم بعد 10 ايام من المعاملة . هذا ويمكن تفسير النتيجة اعلاه في ضوء الآلية التي اشار اليها (19) في ان عملية تكسير الـ **DNA** التي تؤدي الى الموت الخلوي المبرمج (**Apoptosis**) تتم من خلال عامل تكسيرالدنا **(DNA Fragmentation DFF , factor**) المكون من عاملين ثانويين (**45 DFF** و **40 DFF**) ، فبعد تنشيط عملية الموت المبرمج ينشطر الـ **45 DFF** بوساطة انزيم **Caspase 3** وينفصل عن **40 DFF** ، وعليه يتنشط انزيم الـ **40 endonuclease DFF** الذي يعمل على تقطيع **DNA** الكروموسومي . وفي دراسة اخرى (14) حول تاثيرات الكادميوم في استحثاث الموت الخلوي والمادة الوراثية لخلايا الكبد للأسماك ، كانت النتائج بشكل عام مشابهة للدراسة الحالية وعليه يمكن استنتاج بانه على الرغم من امكانية الاستفادة من مستخلصات نبات الآس في المجال العلاجي وغيره الا انه لابد من توخي الحذر وخصوصاً عند استخدام جرع مرتفعة نسبياً ، لذلك لابد من اجراء دراسات لاحقة موسعة حول طبيعة التاثيرات البايولوجية لمستخلصات هذا النبات والجرع الامنة منها .



(ب) (أ)

شكل (1). ترحيل المستخلص الميثانولي المائي لأوراق نبات الآس على صفائح TLC .
أ- عند الفحص بالضوء المرئي ، ب- عند الفحص بالاشعة فوق البنفسجية // الاسهم تشير الى مواقع الحزم ، * الحزم المشركة.

جدول (1). توصيف الحزم المتكونة على صفائح **TLC** للمستخلص الميثانولي المائي لنبات الآس .

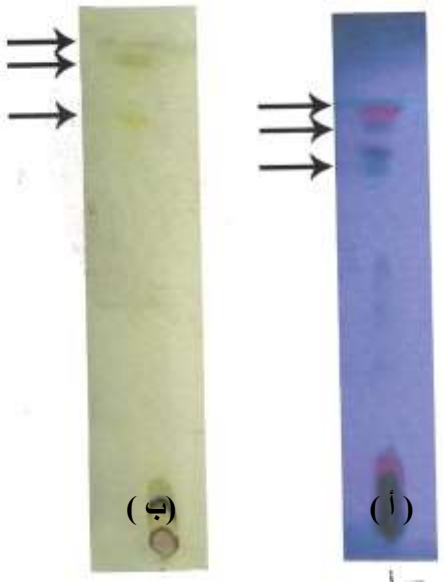
طريقة الفحص	خصائص الحزم		
	قيم **Rf**	اللون	العدد
الضوء المرئي	0.09	بني	6
	0.12*	بني	
	0.17 *	احمر فاتح	
	0.87 *	اصفر	
	0.97 *	اخضر فاتح	
	0.98 *	اخضر فاتح	
الاشعة فوق البنفسجية	0.12 *	اسود	11
	0.16	احمر براق	
	0.17 *	بنفسجي	
	0.38	بنفسجي	
	0.50	بنفسجي	
	0.62	بنفسجي	
	0.68	بنفسجي	
	0.72	ازرق	
	0.87 *	ازرق	
	0.97 *	ازرق	
	0.98 *	احمر براق	

* الحزم المشتركة عند الفحص بالضوء المرئي والاشعة فوق البنفسجية .

جدول (2). نتائج الفحص للقابلية المضادة للاكسدة باستخدام اختبار الرش بالبيتاكاروتين .

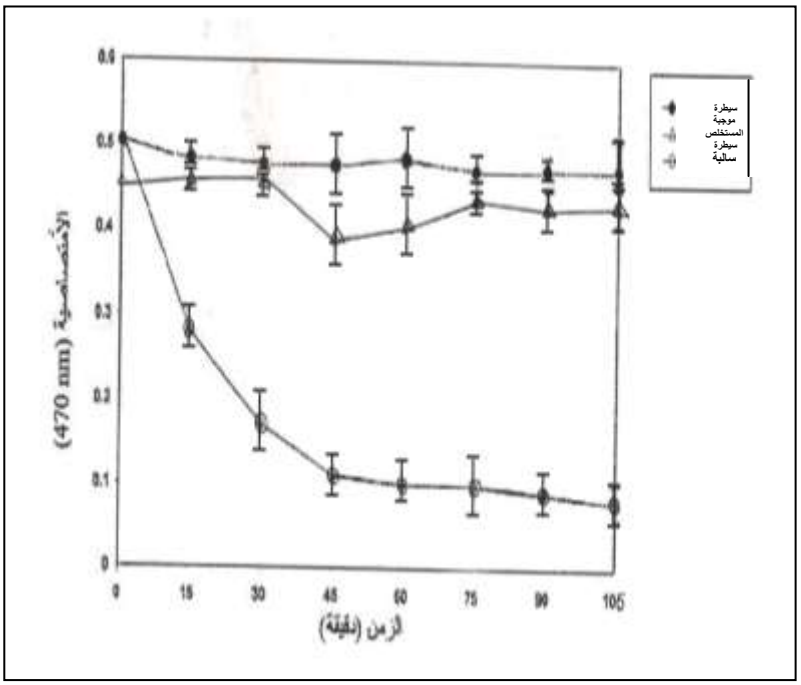
قيم **Rf** للحزم	نتيجة الفحص
0.09	-
0.12	-
0.16	-
0.17	-
0.38	-
0.50	-
0.62	-
0.68	-
0.72	-
0.87	+
0.97	+
0.98	+

الرموز: + : وجود فعالية مضادة للاكسدة (الحزم التي احتفظت باللون الاصفر) .
- : عدم وجود فعالية مضادة للاكسدة



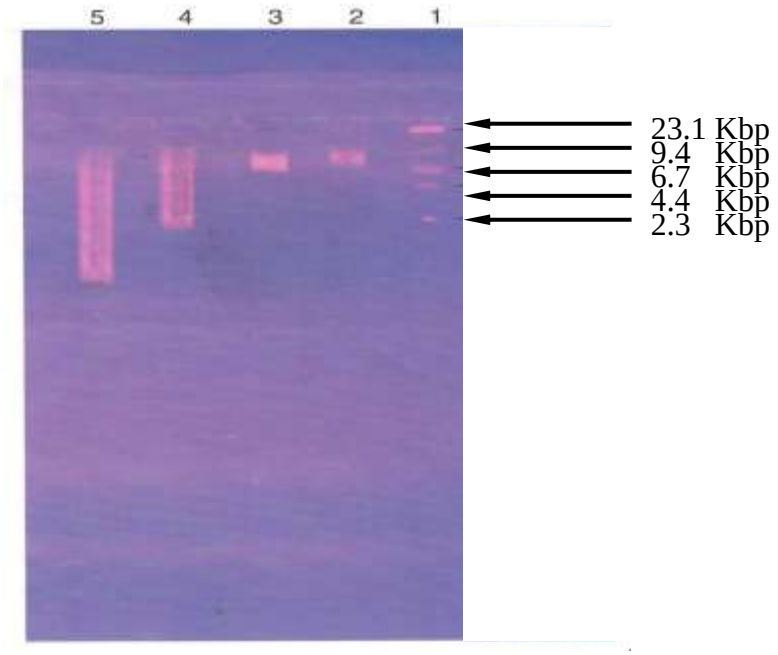
شكل (2). فحص القابلية المضادة للأكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين للمستخلص الميثانولي المائي لأوراق نبات الأس.
أ- قبل الرش ، ب- بعد الرش.
الاسهم تشير الى مواقع الحزم ذات الفعالية المضادة للاكسدة (التي احتفظت باللون الاصفر).

شكل (3) . القابلية المضادة للاكسدة بطريقة الاقترانية للبيتاكاروتين وحامض الينوليك للمستخلص الميثانولي المائي لمستخلص أوراق نبات الآس.



جدول (3) . مستوى تحلل **DNA** المستخلص من خلايا الدم البيضاء للفئران بعد المعاملة بتراكيز تدريجية من مستخلص اوراق نبات الآس.

تراكيز المستخلص (ملغم / 100 مايكروليتر من الراسب الخلوي)	خصائص **DNA**	
	الحجم الجزيئي (كيلو زوج قاعدي)	رقم المجال في الشكل (4)
السيطرة	10 – 20	2
0.001	9 - 19	3
0.005	2 - 20	4
0.010	0.4 – 18	5



شكل (4). الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز(0.7%) بفرق جهد 70 فولت للـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء للفئران المعاملة بتراكيز تدريجية من مستخلص أوراق نبات الآس.

1- DNA الفيروس لامدا المقطوع بالانزيم *Hin*d III والمستخدم كدليل حجمي.
2- DNA محضر من WBC_S لحيوانات مجموعة السيطرة.
3- DNA محضر بعد المعاملة بالمستخلص بتركيز 0.001 ملغم/ 100 مايكروليتر.
4-DNA محضر بعد المعاملة بالمستخلص بتركيز 0.005 ملغم/ 100 مايكروليتر.
5-DNA محضر بعد المعاملة بالمستخلص بتركيز 0.01 ملغم/ 100 مايكروليتر.

المصادر References

1. سعد، شكري ابراهيم . (1972) . تصنيف النباتات الزهرية. الطبعة الثانية، الهيئة المصرية العامة للتأليف والنشر،جمهورية مصر العربية.

1. Rosa, A., Deiana, M., Casu, V., Corona, G., Appendino, G., Bianchi, F., Ballero, M. and Dlssi, M. A. (2003). Antioxidant activity of oligomeric alyphoroglucinols from Myrtus communis L. Free Radic. Res., 37(9): 1013-1019.
2. Romani, A., Coinu, R., Carta, S., Pinelli, P., Galardi, C., Vincieri, F. F. and Franconi, F. (2004). Evaluation of antioxidant effect of different extracts of Myrtus communis L. Free Radic Res., 38(1): 97-103.
3. Hayder, N., Kilani, S., Abdelwahed, A., Mahmoud, A., Meftah, K., Enchibani, J., Ghedira, H. and Chekir-Ghedird,L. (2004). Antimutagenic activity of aqueous extracts and essential oil isolated from Myrtus communis . Pharmacie, 59(7): 523-524.
4. Appendino, G., Biancdi, F., Minassi, A., Sterner, O., Ballero, M. and Gibbons , S. (2002). Oligomeric alykphorglucinols from Myrtus communis. J. Nat. Prod., 65(3): 334-338.
5. Al- Saimary, I. E., Bkr, S. S., Jaffar, T., Salim, H. and Al- Muosawy, R. (2002). Effect of some antibiotics on Pseudomonas aeruginosa. Med. J., 33(7) : 802-805.
6. Ortega, M. and Rodenas, S. (1979). Myrtus communis L. Phytoemagg-lutinns as a clarifying agent for lipemic sera. Clin. Chem Acta., 92 (2): 135-149.

7. Elfelleh, M. S., Akhter, M. H. and Khan, M. T. (1984). Antihyperglycaemic effect of an extract of Myrtus communis in strepocotocin induced diabetes in mice. Jethnophar-macol., 11(3): 275-281.
8. Sepici, A., Gurbuz, I., Cevik, and Yesilada, E. (2004). Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan diabetic rabbits. Jethnopharmacol., 93(2-3): 311.
9. Sato, M., Ose, Y., Nagase, H., Kito, H. and Sakai, Y. (1990). Mechanism of antimutagenicity of aquatic plant extracts against benzo(a) pyrene in the Salmonella assay. Mut. Res. , 241:283-290.
10. Vekiari, S. A., Orcopoulo, V. and Thomopoulos, C.D. (1993). Oregano flavonoids as lipid antioxidants. JAOCS. ,70(5): 483-487.
11. Pratt, D. E. and Miller, E. E.(1984). A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts. JAOCS., 61(6): 1064-1071.
12. Pratt, D. E. and Birac, P. M. (1979). Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. J. Food ., Sci. 44:1720
13. Risso-de Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.P., Bailly, B. and Rahmani, R. (2001). Cadimium induces apoptosis and genotoxicity in rainloow trout hepayocytes through generation of reactive oxygene species. Aquatic toxicology, 53: 65-76.
15.Sambrook, J. and Russel,R.W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed.Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
16. Prifer,U.(1984). Characterization of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis, In: Advanced molecular genetics. (ed. Puhler, A. and Timmis, K.N.). Springer Verlage, Berline. , p:26-37.
17. Traboulsi, A.F., Taoubi, K., El-Haj, S., Bessiere, J. M. and Romal, S. (2002). Insecticidal properties of essential oils against the Mosquito culex pipens molestus(Diptera: culicidea). Pestmanag Sci., 58(5): 491-495.
18. Vehleke, H. and Brinkschulte- Freitas, M. (1979). Oral toxicity of essential stimulation Myrtus and adative liver stimulation. Toxicology, 12(3): 335-342.
19. Hua, Z. J. and Xu, M. (2000). DNA fragmentation in apoptosis . Cell Res., 10: 205-211.