المجلة الطبية البيطرية العراقية 35 (2): 182 – 189 ،2011.

التأثير التثبيطي للمستخلصين الكحولي والمائي لاوراق وسيقان الدفله " *Nerium oleander* " على بعض الفطريات في الزجاج

فدوى عبد الرزاق جميل

فرع الاحياء المجهرية - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد

الخلاصة

استهدفت الدراسة الحالية تقيم تأثير المستخلصين الكحولي والمائي لاوراق وسيقان نبات الدفلة*Nerium oleander*على نمو *Trichophyton mentogrophytes* و *Cryptococcus neoformens* في الزجاج.

اظهر المستخلص الكحولي لاوراق وسيقان نبات الدفلة على الفطريات المدروسة تأثيراً تثبيطياً وخاصة على*Trichophyton mentogrophytes*مقارنة بالمستخلص المائي لاوراق وسيقان النبات الذي اظهر تأثير اقل او معدوم ضد الفطريات المدروسة كانت اعلى نسبة تثبيط للمستخلص الكحولي لاوراق وسيقان النبات ضد *Trichophyton mentogrophytes*83.3% 67% على التوالي عند التركيز 20ملغم/مل بينما كانت نسبة تثبيط المستخلص المائي لاوراق وسيقان النبات على نفس الفطر 30% و 0% على التوالي عند تركيز20 ملغم/مل . اما الجزء الاخر من الدراسة والمتضمن تأثير المستخلص الكحولي والمائي لاوراق وسيقان النبات على خميرة*Cryptococcus neoformens*اعتماداً على قياس قطرالتثبيط لخميرة*Cryptococcus neoformens* حيث كان قطر التثبيط للمستخلص الكحولي لاوراق وسيقان النبات 30ملم 22 ملم على التوالي عند التركيز 20ملغم/مل بينما لم يظهر اي تثبيط للمستخلص المائي لاوراق وسيقان النبات ضد *Cryptococcus neoformens* ويمكن ان نستنتج من هذه الدراسة بان نبات الدفلة *Nerium oleander* وهو من النباتات السامة يمكن استخدامه بالاخص المستخلص الكحولي لاوراق وسيقان هذا النبات كمضاد للفطريات ضد *Trichophyton mentogrophytes* و *Cryptococcus neoformens*.

The Inhibitory Effect of Leaves and Stems of *Nerium oleander* Alcoholic and Aqueous Extracts on Some Fungi In Vitro

Fadwa Abdul AL-RazaqJameel

Department of Microbiology - College of Veterinary Medicine – Baghdad University

Accepted on 27/9/2011

Summary

The objective of the current study was to evaluate the effect of alcoholic and aqueous extract for leaves and stems of *Nerium oleander* on *Trichophyton mentogrophytes and Cryptococcus neoformens* in vitro. The effect of alcoholic extract for *Nerium oleander* leaves and stems on the tested fungi was showed inhibitory effect specialy on *Trichophyton mentogrophytes* compared with aqueous extract of leaves and stems of plant which showed less or no inhibition against the tested fungiA high inhibition rate of alcoholic extract of leaves and stems of plant aginst *Trichophyton mentogrophytes* were 83.3% and 67% respectively in concentration 20mg/ml. But the inhibition rate of aqueous extract of leaves and stems of plant on the same fungus were 30% and 0%

respectively, in concentration 20mg/ml. The other aspect of the current study for the effect of alcoholic and aqueous extracts leaves and stems against *Cryptococcus neoformens* was done by measuring the diameter of inhibition zone of alcoholic extract of leaves and stems of the plant were 30mm and 22mm respectively in aconcentralion 200mg/ml where no inhibition zone for the aqueous extracts of leaves and stems of the plant against *Cryptococcus neoformens*. The conclusion of this study revealed that the *Nerium oleander* plant (Toxic plant) can be used as antifungal particulary the alcoholic extract of leaves and stems agairst *Trichophyton mentogrophytes and Cryptococcus neoformens*.

Keywords:Trichophyton mentogrophytes ,Cryptococcus neoformens,*nerium,toxic plant, *Nerium oleander

المقدمة

نبات الدفلة من نباتات الزينة دائمة الخضرة والمزهرة طيلة ايام السنة تتحمل مديات واسعة من درجات الحرارة المعتدلة او العالية(1) تصنف الدفلة ضمن عائلة الدفليات Apocyuaceae(dog bare family) واغلب نباتات هذه العائلة سامة وهي تابعة لرتبة Gentianales صنف Magnoliopsida من شعبة Magnoliophy الاسم العلمي للنبات(2)*Nerium oleander* للدفلة عدة تسميات محلية منها الدفلة أو سم الحمار أو وردة الحمار ولها التسمية نفسها في بلاد الشام والعالم العربي والاسم الشائع لها في البرازيل هو Espirraderia وفي الارجنتين Laurelrose وفي برطانيا تدعى Olearder وفي هاواي Oleane و Oliwa وفي كوريا Rose fonasa وفي امريكيا Rosebay(3,2)

الدفلة سريعة النمو خشبية السيقان وتعرف بازهارها البيضاء النقية أو الوردية أو الحمراء والسلالات المختلفة تنتج ازهارآ متدرجة في الوانها بين الوردي الشاحب الى الغامق القرمزي ونادرآ البرتقالي(4) على الرغم من سمية النبات العالية لكل من الانسان والحيوان فقد استخدم المستخلص المائي والدهني والكحولي في معالجة الكثير من الامراض في الطب الشعبي العربي وطب الاعشاب الصيني(6,5) لقد استخدمت الدفلة في عدة علاجات ومنها حالات نقص الوزن الحاد والاسقاط المتكرر ومسامير الرجل وضعف القلب وضد القوباء الحلقية (Ring worm)والثؤلل والتقرحات والخراجات والاكزمات والجذام وكذلك لمعالجة بعض الامراض التناسلية وكمانع للحمل وكمدرر للبول ومضاد للالتهابات (8،7و9) وقد استخدمت ايضآ كسم للجرذان وكمبيد للطفيليات(10) وبناء على ما تقدم اجريت هذه الدراسة لايجاد مضاد للفطريات عن طريق استخدام مستخلصات من نبات الدفلة (مستخلص كحولي ومائي) ودراسة فعالية هذه المستخلصات على نمو فطر *Trichophtonmentogrophytes* وخميرة *Cryptococcus neoformens* باستخدام تراكيز مختلفة في الزجاج

المواد وطرائق العمل

جمع وتحضير النبات:-جرى جمع نبات الدفلة *Nerium oleander* بصورة طبيعية من منطقة الغزالية في بغداد حيث تم فصل الاوراق عن السيقان كلآ على حدة ونظفت الاوراق والسيقان ثم غسلت وجففت في الظل بدرجة حرارة الغرفة وبعدها طحنت باستخدام مطحنة كهربائية وحفظت في علبة زجاجية(11) . لتحضير الخلاصة الكحولية لنبات الدفلة للاوراق والسيقان كلآ على حدة جرى استخدام الكحول الاثيلي بنسبة 70% (اي بمزج 70مل من كحول الايثانول المطلق Ethanol absoluteويكمل الحجم الى 100مل باستخدام الماء المقطر (Distilled water) وحسب طريقة(13و12) والتي تتلخص كالاتي:- تم وضع(100غم) من مسحوق اوراق النبات في دورق زجاجي وكذلك بالنسبة للسيقان المطحونة . ثم اضيف (500مل) من الكحول الاثيلي (70%) الى

الدورق الحاوي على مسحوق النبات واغلقت الفتحة بواسطة فلينة وكذلك بالنسبة لمسحوق السيقان. وضع الدورق على جهاز الهزاز المغناطيسي Magnetic stirrer وترك ليمتزج بواسطة مازج مغناطيسي Magnetic bar . وبعد مرور (24 ساعة) رشح المحلول باستخدام الشاش الطبي اولآ ثم ورق الترشيح. وضع الرائق في اطباق بعد تسجيل وزن كل طبق وهو فارغ. جفف الراشح باستخدام Oven بدرجة حرارة (40℃). ثم تم وزن الخلاصة الكحولية (70%) الناتجة من (100غم) من مسحوق اوراق وسيقان النبات بطرح وزن الطبق فارغآ من وزنة وهو حاوي على الخلاصة. حفظت كمية المستخلص بدرجة حرارة (-18م) لحين الاستعمال تم تحضير المستخلص المائي لنبات الدفلة بنفس الطريقة السابقة مع استخدام الماء المقطر بدلآ من الكحول الاثيلي لمسحوق الاوراق والسيقان لنبات الدفلة

الفطريات المرضية المستخدمة: فطر *Trichophtonmentogrophytes* المعزولة من اصابة جلديه في الاغنام من حقل كلية الطب البيطري / جامعة بغداد. خميرة *Cryptococcus neoformens* المعزولة من جلد مصاب بالخميرة المذكورة وقد حصلنا عليها من مختبرات الفطريات / كلية الطب البيطري. تم زرع الفطريات المرضية على وسط السبروبد دكستروز أكار (SDA) وتم حفظهما بدرجة حرارة (4م) لحين استخدامها

تحضير المحلول القياسي (Stock solution) لمستخلصات نبات الدفلة: تم تحضير المحلول الاصلي Stock solution للخلاصة الكحولية والمائية لنبات الدفلة بحسب طريقة(14) من خلال اذابة (1000ملغم) من المستخلصين (الكحولي والمائي لاوراق وسيقان النبات الدفلة) في (10مل) من الماء المقطر المعقم كلآ على حده واصبح التركيز النهائي (100ملغم/مل) بعد ذلك تم ترشيح المستخلصات باستخدام Millipore filters (022um) ومن ثم تحضير التراكيز المطلوبة.

دراسة تأثير المستخلصات على فطر *Trichophtonmentogrophytes*بطريقة مزجها مع الوسط: اتبعت طريقة(15) وكالاتي: للحصول على التراكيز المختلفة (5 10 20)ملغم/مل تم مزج (1مل) من المحلول القياسي (100ملغم/مل) واكمل الحجم الى 20مل من وسطSDA للحصول على التركيز (5ملم). وللحصول على تركيز (10ملغم/مل) تم مزج (2مل) من المحلول القياسي واكمل الحجم الى 20مل من وسط SDA . اما بالنسبة للتركيز (20ملغم/مل) تم مزج (4مل) من المحلول القياسي واكمل الحجم الى 20مل من الوسط الزرعي (SDA) في الاطباق الزرعية اما بالنسبة للسيطرة رقم (1) فقد تم اضافة (1مل) من محلول عقار Clotrimazole بترك. اما السيطرة رقم (2) تضمنت طبق حاوي على الوسط بدون اضافة اي مادة وبعد حفظ الاطباق في الثلاجة لكي تجمد ثم زرع الفطر على الاطباق ووضعها في الحاضنة بدرجة (25م) لمدة (7) ايام ومن ثم تم تطبيق المعادلة التالية:-

$$\text{نسبة التثبيط} = \frac{\text{معدل قطر الفطر في اطباق المقارنة} - \text{معدل قطر الفطر في اطباق المعاملة}}{\text{معدل قطر الفطر في اطباق المقارنة}} \times 100$$

دراسة تأثير المستخلصات على نمو خميرة *Cryptococcus neoformens*بطريقة الانتشار في الحفر: اتبعت طريقة **(16).**

النتائج والمناقشة

لقد تضمنت هذه الدراسة تحضير المستخلص الكحولي والمائي لاوراق وسيقان نبات الدفلة ودراسة فعاليتها في تثبيط نمو الفطريات المرضية في الزجاج. تم الحصول من طريقة تحضير الخلاصة الكحولية لاوراق وسيقان النبات كلآ على حده على وزن (11.08غم) من (100غم) من مسحوق اوراق وسيقان النبات الجاف اي بنسبة استخلاص بلغت (11.08%) وكانت الخلاصة لكليهما عبارة عن خلاصة سميكة ذات لون اخضر غامق متألق عالية اللزوجة ولها القابلية على الاذابة في الماء بعد

التحريك لبعض دقائق وهذه النسبة اتفقت مع(17) الذي حصل على نسبة استخلاص بلغت (11.25%) للمستخلص الكحولي لاوراق نبات الدفلة بينما حصل على نسبة استخلاص بلغت 13.37% للمستخلص الكحولي لسيقان نبات الدفلة. لقد تم اختيار الخلاصة الكحولية لاوراق وسيقان نبات الدفلة من هذه الدراسة وذلك لسهولة الحصول على هذه الخلاصة وبكميات كافية اذ ان استخدام طرق معقدة للحصول على مواد فعالة من النبات يحتاج الى تقنيات عالية تزيد بدورها من كلفة العلاج وقد استخدمت اوراق وسيقان النبات بدون فصل مركباتها الفعالة بعضها عن البعض وذلك للدلالة على الفعل التأزري للمواد مع بعضها والتي تؤدي الى انتاج فعالية ايجابية للعلاج كما وتم الحصول من طريقة تحضير الخلاصة المائية لسيقان نبات الدفلة على وزن (16.01غم). بينما تم الحصول من طريقة تحضير الخلاصة المائية لسيقان النبات على وزن (11.87غم) من (100غم) من مسحوق سيقان النبات الجافة اي بنسبة بلغت (1187%) وكانت الخلاصة المائية لكليهما عبارة عن خلاصة هشة ذات لون اخضر غامق متألق. ان الجدول (1) يمثل معدل اقطار مستعمرات *Trichophton mentogrophytes*الناتجة عن التأثير المثبط للمستخلص الكحولي لنبات الدفلة والنسبة المئوية للتثبيط اذ بلغ معدل قطر مستعمرات *Trichophton mentogrophytes* عند تركيز 20ملغم/مل 10ملم في حين كانت نسبة التثبيط (83.3%) وهي اعلى نسبة تثبيط تم الحصول عليها ويعود السبب في ذلك لما تحوية الدفلة من مركبات مختلفة لها فعالية تثبيطية ضد الفطريات وخاصة ضد *Trichophton mentogrophytes* وهذا ما اكد علية(18) الذي اشار الى قابلية نبات الدفلة على تثبيط *Trichophton mentogrophytes* كما واوضحت العديد من الدراسات ومنها(19). احتواء الدفلة على مركبات كيميائية منها السمية وغير السمية وبتراكيز مختلفة في اجزاء النبتة الواحدة حيث شملت المركبات السمية على الكلايكوسيدات القلبية اما المركبات غير السمية والتي تكون اما حرة او مرتبطة بمجموعة من السكريات المعقدة فشملت على الفلافونات بنسبة 0.5% ursolicacidبنسبة 43% المطاط 0.049% والستيرويدات0014% الزيوت الطيارة والدهون والبروتينات. كما واكد المصدر(20) احتواء اوراق نبات الدفلة على القلويات والصابونات والفلافونات والعفصيات. حيث تعتبر الفلافونات الموجودة في اوراق نبات الدفلة ذات خاصية قاتلة للفطريات(21). وكذلك الصابونيات وحامض Ursolic acid اللذان يمتلكان فعالية مضادة للبكتيريا والفطريات(22).

جدول (1): **يوضح تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص الكحولي لاوراق نبات الدفلة على نمو *Trichophtonmentogrophytes* في الزجاج**

التركيز ملغم/مل	معدل قطر المستعمرة (ملم)	النسبة المئوية للتثبيط(%)
سيطرة	60	0
5	25	583
10	15	75
20	10	833
(1%) Clotrimazole	5	100

كما يشير الجدول (2) الى معدل اقطار مستعمرات*Trichophton mentogrophytes* الناتجة عن التأثير المثبط للمستخلص الكحولي لسيقان نبات الدفلة والنسبة المئوية للتثبيط حيث بلغ معدل قطر المستعمرة عند تركيز 20ملغم/مل (20ملم) في حين كانت نسبة التثبيط اقل مما هو علية في اوراق نبات الدفلة (67%).

يمكن ان نستنتج من ذلك بان المستخلص الكحولي للاوراق افضل من المستخلص الكجولي للسيقان لنبات الدفلة ويعود السبب من ذلك لما تحوية اوراق نبات الدفلة على مركبات وخاصة الفلافونات[20] التي تتمركز في الاوراق اكثر من السيقان.

جدول (2) :يوضح تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص الكحولي لسيقان نبات الدفلة على*Trichophtonmentogrophytes* في الزجاج

التركيز (ملغم/مل)	معدل قطر المستعمرة (ملم)	النسبة المئوية للتثبيط(%)
سيطرة	60	0
5	50	17
10	30	50
20	20	67
(1%) Clotrimazole	5	100

كما اوضح الجدول (3) و (4) تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص المائي لاوراق وسيقان نبات الدفلة على نمو*Trichophton mentogrophytes*حيث بلغ معدل قطر المستعمرة للفطر المذكور عند التركيز 20ملغم/مل لاوراق نبات الدفلة (42ملم) بينما كانت نسبة التثبيط 30% عند نفس التركيز. اما بالنسبة للسيقان فلقد بلغ معدل قطر المستعمرة عند نفس التركيز (60ملم) وعدم وجود نسبة تثبيط الفطر *Trichophtonmentogrophytes* وهذا ما اكد علية المصدر(23) بان المستخلص المائي لاوراق نبات الدفلة تثبط نمو السبورات لبعض الانواع من الفطريات ومن هذا يمكن ان نستنتج: بان المستخلص الكحولي لاوراق وسيقان نبات الدفلة افضل من المستخلص المائي على فطر *Trichophtonmentogrophytes* وعدد من الفطريات الاخرى ويعود السبب في ذلك الى فعالية كحول الاثيلي70% له قابلية على ذوبان المركبات المستقطبة والغير المستقطبة وهذه النتيجة اتفقت مع ما جاء بة(24)الذي بين بان المستخلص الكحولي يمتلك فعالية كبيرة ضد الفطريات مقارنة مع المستخلص المائي. كما واكد (25،21و26) بان المستخلص الكحولي لاوراق نبات الدفلة يمتلك افضل فعالية تثبيطية ضد الفطريات ومنها*Trichophtonmentogrophytes* .

جدول(3) :يوضح تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص المائي لاوراق نبات الدفلة على *Trichophtonmentogrophytes* في الزجاج

التركيز (ملغم/مل)	معدل قطر المستعمرة (ملم)	النسبة المئوية للتثبيط(%)
سيطرة	60	0
5	60	0
10	50	166
20	42	30
(1%) Clotrimazole	5	100

جدول (4) :يوضح تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص المائي لسيقان نبات الدفلة على نمو*Trichophtonmentogrophytes*في الزجاج

التركيز (ملغم/مل)	معدل قطر المستعمرة (ملم)	النسبة المئوية للتثبيط(%)
سيطرة	60	0
5	60	0
10	60	0
20	60	0
(1%) Clotrimazole	5	100

كما واوضح الجدول (5) تأثير مستخلصات الكحولية والمائية لاوراق وسيقان لنبات الدفلة على معدل اقطار نمو *Cryptococcus neoformens*في الزجاج ولقد اعطى المستخلص الكحولي لسيقان الدفلة اعلى معدل قطر وقد بلغ 30ملم مقارنة بالمستخلص الكحولي لاوراق نبات الدفلة في حين كان معدل قطر المستعمرة معدوم بالنسبة للمستخلص المائي لاوراق وسيقان نبات الدفلة ضد *Cryptococcus neoformens* .

جدول (5): يوضح تأثير مستخلصات مختلفة لنبات الدفلة على معدل قطر التثبيط لخميرة *Cryptococcus neoformens* مقاسة بالـ(ملم) في الزجاج:-

التركيز (ملغم/مل) / (نوع المستخلص)	سيطرة	10	25	50	100	200
1- مستخلص كحولي لاوراق نبات الدفلة	0	10	15	15	20	22
2- مستخلص كحولي لسيقان نبات الدفلة	0	15	15	20	25	30
3- مستخلص مائي لاوراق نبات الدفلة	0	0	0	0	0	0
4- مستخلص كحولي لسيقان نبات الدفلة	0	0	0	0	0	0

ومن خلال هذه الدراسة يمكن ان نستنتج بان مادة الفلافونات والعفصيات بالاضافة الى المركبات الاخرى الموجودة في نبات الدفلة بانها افضل مركبات كيموحيوية مضادة للمايكروبات ومنها الفطريات وهذى ما اكد علية المصدر(27)الذي بين ميكانيكية عمل هذه المركبات ضد الجراثيم والتي شملت على تثبيط الانزيم بواسطة المركبات المؤكسدة كما وتعمل ايضآ كمصدر للجذور الحرة الثابتة Stable free readical وهذا غالبآ ما يؤدي الى عدم تنشيط البروتين او فقدان وظيفته او ان لهذه المركبات القابلية على تكوين معقد مع البروتينات خارج الخلية extra cellular والبروتينات المذابة وتكوين معقد ايضآ مع جدار الخلية البكتيرية وهذا بدوره يؤدي الى تحطيم اغلفة المايكروب .وهذا ما اكد علية(28). كما واشار بعض الدراسات ومنها(29) الى توضيح ميكانيكية المستخلصات النباتية وخاصة مستخلصات نبات الدفلة ويعود عملها الى وجود مركبات الفينول *phenolic compounds*والتي منها الفلافونات حيث ان لهذه المركبات المقدرة على التداخل مع الغشاء الحيوي وبالتالي يمتلك الفعالية المضادة للمايكروب وبواسطة هذه الميكانيكية التي تمتلكها المستخلصات النباتية تكون لها القدرة على الحد من نمو او تثبيط الخيوط الفطرية(30). واكد(31) بان مركبات الفينول التابعة للمستخلصات النباتية لها القدرة على العمل على الخيوط او الغزل الفطري mycelium وتؤدي الى فقدان صلابة واستقامة الجدار الخلوي للخيط الفطري ومن ثم انكماش وموت الغزل الفطري التابع للفطر.

References

1. Mahin L Marzou A and Huart A (1984). Acase Report of Nerium oleander poisoning in cattle . Vet Hum Toxicology. 26:303-304.
2. Inchem (2005). Nerium oldeander lin (PIM 366) International oleander Society and International poisoning control Society .P1-3.
3. Perry LM (1980). medicinal plants of East and South east Asia Massachusetts Institute of Technology USA .P 140.

4. Huxley A (1992). The New horticultural Society Dictionary of gardening London Macmillan. p 230.
5. مجيد هاشم مجيد وجميل محمود مهند (1988) النباتات والاعشاب العراقية بين الطـــب الشعبي والبحث العلمي مركز بحوث علوم الحياة / العقاقير وتقيم الادوية ص274
6. Huan K C (1999) . The pharmacology of Chinese herbs Boca Raton FLCRC Press. p212.
7. Duke JA(1985). Hand Book of medicinal Herbs Florida USA CRC press lnc p400.
8. Chopra R N Nayar SL and chopra IC (1986). Glossary of Indian medicinal plants (Including the supplement) Council of Scientific and industrial Research New Delhi.
9. El-Ghar GESA and El-sheikh AE (1987).Effectiveness of some plant extracts as surface protectants of cowpea Seeds against the pulse beetle Calloso bruchus chinesis phyto parasitica. 15 : 109-113.
10. Chiej R(1984). Encyclopaedia of medicinal plants mac Donald .p 478.
11. رويحة امين (1971) التداوي بالاعشاب الطبعة الثالثة بيروت لبنان
12. Harborne JB (1973). phyto chemical methods Halste press John wiley and sone New york p278.
13. Harborne JB (1984). phytochemical methods Aquide to modern techniques of plant analysis chaman and Hall 2nd ed New York. p288.
14. Ammash HS AL-Jahir H Hameed ZMohammed Sand Mamza H(1993).Anti microbiol activity of tea extract against gram positive and gram negative bacteria Iraqi J of Microbiol .5(1): 1-13 .
15. Al-Khaphagi BRA (2000). Effect of withania somnifera salvia officinalis and salix acmophylla extracts on the growth of some dewatophytes MSC Thesis college of science-mustan-soriya university .
16. Mahmood MJJawad AYHussain AMAL-Dmari Mand Al-Naib A(1989) .In vitro antimicrobial activity of salsola rosemarinus and adiatum capillusveneris Int Jcrude .Druy Res.27 :14-16 In :Najim JM (2003) . prevalence of Ring worm and therapeutic studies of thymbra Spicata and Ruta chale pensis phD Thesis college of veterinary medicine-baghdad university-Iraq .
17. Boulenouar N Marouf A and Cheriti A (2009). Effect of some poisonous plants extracts on Fusarium oxysporum fsp albedinis. J Biolog Sci.s 9(6):594-600.
18. Sathiamoorthy BGupta PKumar M chaturvedi AKShukla PK M chaturvedi A K Shukla PK and Maurya R(2007) .New antifungal flavonoid glycoside from vitex hegundo medicinal and process chemistry division Central Drug Research Institute India.
19. Hatif Z A (2009). Acute toxicity study of three types of Nerium oleander leaves of hexane extracts in mice and estimation of their glycosides M SC thesis collage of veterinary medicine university of Bagdad-Iraq .
20. Ritchi Mperea DemosthenesV Manalang Leopoldo IDe Ramos and GregoriioS Tan (1982). phytochemical Screening and microbiological assay of Nerium oleander (Adeifa) Abstract.
21. FardosM Bokhari (2009). Antifungal activity of some medicinal plants used in Jeddah Saudi Arabia Mycopath .7(1) : 51-57 .
22. Garima zibbu and Amla Batra (2010). Areview on chemistry and pharmacological activity of Nerium oleander J of chemical and pharmaceutical Research 2(6) : 351-358.
23. Abdel-Raouf M Khallil (2001).phytofungitoxic properties in the Aqueous extracts of some plants .Pakis J Biolog Sci. 4(4): 392-394.
24. Cowan M M (1999). plant products as antimicrobial agents Clinical Microbiol Rev 12(4):564-582.

25. Shi J pohorly J Young J C Bryan M and wu y (2003). optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution . J Food Agric-Environ.
26. Omidbeygi M Barzegar M Hamidi Z and Nafhdibadi H(2007). Antifungal activity of thyme summer savory and clove essential oils against Aspergillus flavus in lipuid medium and tomato paste Food control.18 :1518-1523.
27. Aly MM and Bafiel S (2008). Screening for antimicrobial activity of some medicinal plants in Saudi Arabia World conference on medical and aromatic .
28. Ali AA(1999). Studies on some medicinal plants as a source of antifungal substances in North Africa M SC Thesis Inst of African Res and studies Cairo univ .
29. Veldhuizen EJ Tjeerdsmavan Bokhoven J L zweij tzer C Burt S A and Haagsman H P(2006). structural requirements for the Antimicrobial activity of Carvacrol.J Agric Food che. 54 :1874-1879.
30. Hadizadeh L peivasteg an B and Kolahi M (2009) .Antifungal activity of Nettle (urtica dioica L) colocynth (citrullus colocynth is L Schrad) oleander (Nerium oleander L) and Konar (Ziziphus spina- Christi L extracts on plants pathogenic fungi pak. J BiolSci 12:58-63.
31. Sharma N and Tripathi A (2006). Fungitoxicity of the essential oil of citrus sinensis on post-harvest pathogen world . J Microbiol Biotechnol. 22 :587-593.