

فعالية المستخلص الكحولي لقشور ثمار الرمان في مكافحة الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لموت بادرات القطن

كريم عبدالله حسن البياتي¹ محمد نديم قاسم حنتوش² عماد عدنان² نهاد عزيز خماس²

¹ جامعة كركوك - كلية الزراعة

² جامعة ديالى - كلية الزراعة

• تاريخ تسلم البحث 2016/10/16 وقبوله 2017/1/8

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة لتقويم كفاءة المستخلص الكحولي لقشور ثمار الرمان في تثبيط نمو الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لمرض موت البادرات في القطن مختبرياً وتحت ظروف البيت الزجاجي. اختبرت سمية التراكيز 0، 5، 10، 15، و 20 ملغم/مل من المستخلص الكحولي لقشور الرمان بالمقارنة مع المبيد الحيوي بايوكونت في نمو الفطر الممرض. بلغت نسب التثبيط في نمو الفطر الممرض بتأثير سمية هذه التراكيز 0، 42، 54، 72، 75% بالتتابع. اما في البيت الزجاجي فقد تفوقت معاملة المبيد الحيوي بايوكونت على بقية المعاملات، اذ بلغت النسبة المئوية لموت البادرات قبل وبعد البزوغ تحت تأثير هذه المعاملة 29.2، 16.6% بالتتابع في حين بلغنا 38.3، 33.3 بالتتابع قياسا بمعاملة المقارنة التي اعطت 62.2، 45.8% بالتتابع. كما بلغ ارتفاع النبات والوزن الجاف للنبات في معاملة المبيد الحيوي 15.8 سم، 475 ملغم بالتتابع، في حين بلغنا 12.9 سم، 411 ملغم قياسا بمعاملة المقارنة التي اعطت 9.2 سم، 288 ملغم بالتتابع.

الكلمات المفتاحية: موت البادرات، القطن، *Rhizoctonia solani*، قشور ثمار الرمان، البايوكونت.

Activity Of Pomegranate Peel Extract In Controlling the Fungus *Rhizoctonia Solani* The Caused Of Damping Off Cotton Seedling

Kareem A.H. Al Beyati Mohammed N.K. Hantoosh Emad Adnan Nehad A. Khamaas

- ¹University of Kirkuk - Collage of Agriculture
- ²University of Diyala - College of Agriculture
- Date of research received 10/16/2016 and accepted 8/1/2017

Abstract

This study was carried out to evaluate the antifungal activity of ethanol extract for Pomegranate peel ethanol extract against *Rhizoctonia solani* that caused cotton seedling damping-off on PDA and under greenhouse condition. The toxic concentration, 0,5,10,15,20 mg/ml of Pomegranate peel extract were tested in growth fungus pathogen. The inhibition percentage of fungal growth was found to be 0,42,54, 72,75% respectively. However, in the greenhouse found that soil treatment with Biocont was more significant reduction in the percentage of seedling damping off pre and post emergences compared with the other treatments. The percentage of damping off pre and post emergences were reached 29.2,16.6% respectively with Biocont treatment, while were reached 38.3, 33.3% respectively with Pomegranate peel ethanol extract, compared with control treatment with the presence of pathogen fungus where the percentage of seedling damping off pre and post emergence were reached 62.5, 45.8% respectively. Biocont and Pomegranate peel treatments showed increase in plant height and dry weight compared with the treatment of the pathogenic fungi only .

Key words: Damping-off, Cotton, *Rhizoctonia solani*, Pomegranate peel, Biocont

المقدمة

ان محصول القطن *Gossypium hirsutum* أحد أهم نباتات العائلة الخبازية Malvaceae كونه أهم مصادر الألياف والزيوت في العالم وتشكل المساحة العالمية المزروعة به 3% من المساحة المزروعة عالمياً (Gopalaswamy وآخرون، 2000، Mayee وآخرون، 2002). تعتبر المسببات المرضية الفطرية أحد أهم العوامل المحددة لنمو وانتاج هذا المحصول خاصة تلك المسببات المرضية التي تسبب موت البادرات قبل وبعد البزوغ والتي منها الفطر *R. solani* (EI- Akkad وSalwa، 1997). ان هذا الفطر من أسرع المسببات المرضية المحمولة بالتربة قتلاً للعائل من خلال انتاجه العديد من الانزيمات والسموم ذات الدور الفعال في قابليته الامراضية (Dillard، 1987، دكسون، 1992). اذ ان الفطر يهاجم النبات في جميع مراحل النمو ويكون اكثر خطورة في المراحل الاولى من عمر النبات (جبر وآخرون، 2008). جرت محاولات عديدة لإيجاد بدائل لهذه المبيدات تكون اكثر امنا على البيئة فالت عوامل المكافحة الاحيائية اهتمام الكثير من الباحثين كونها صديقة للبيئة وفعالة على المدى الطويل التي منها الفطر *Trichoderma harzianum* اذ يمتلك هذا الفطر العديد من الآليات التي تعمل للحد من نمو وانتشار المسببات المرضية وخاصة المحمولة في التربة فالتطفل وانتاج المضادات الحيائية والانزيمات المحللة لجدران المسببات المرضية فضلا عن قابليته العالية في المنافسة على المكان وانتاج منظمات النمو النباتية جعلته في مقدمة عوامل المكافحة الاحيائية فعاليتاً في مكافحة تلك المسببات المرضية (Harman، 2000 والسامرائي، 2002 وHowell، 2003 و Holmes وآخرون، 2004 و Barakat وآخرون، 2007 وعبود وآخرون، 2008). كما ظهر اهتمام الباحثين بتطبيق اخر من تطبيقات المكافحة وهو استعمال المستخلصات النباتية التي تعد بدائل واحدة عن المبيدات الكيميائية لما تحويه الاجزاء النباتية المختلفة من مركبات فينولية وزيوت طيارة (EI-Astal وآخرون، 2005). ومن هذه النباتات الرمان *Punica granatum* اذ ان قشور ثماره غنية بالكثير من المركبات النباتية الطبيعية كالفينولات والتانينات والفلافونات والاحماض العضوية المثبطة لنمو الاحياء المجهرية الفطرية والبكتيرية وكذلك المانعة للأكسدة (Negi و Jayaprakasha، 2003، Vasconcelos وآخرون، 2003، Supayang وآخرون، 2005، Alzoreky، 2009، Dahham وآخرون، 2010، Moussa وآخرون، 2011، Neelam وSingh، 2012، Hajoori وآخرون، 2014). فهدفت الدراسة الى استعمال هذين العاملين في مكافحة الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لموت بادرات القطن.

المواد وطرائق البحث

تم عزل الفطر *R. solani* من بادرات قطن مصابة، حيث كانت الاصابة الوحيدة. غسلت بماء الحنفية وقطعت الى قطع صغيرة بطول 0.5 سم من مناطق الاصابة. عقت القطع بمحلول هايپوكلورات الصوديوم (1% كلور حر) لمدة دقيقة واحدة وغسلت بماء مقطر معقم ثلاث مرات. جففت القطع على اوراق ترشيش معقمة وزرعت في اطباق بتري قطرها 9 سم حاوية على الوسط الزراعي Potato Dextrose Agar (PDA) مضافاً له المضاد الحيوي Ampicillin بمعدل 100 ملغم / لتر بواقع ثلاث قطع لكل طبق. حضنت الاطباق في درجة حرارة 25 ± 2 م لمدة اربعة ايام. نقي الفطر بنقل اطراف من الغزل الفطري الى اطباق بتري حاوية على الوسط الزراعي Potato Dextrose Agar. حضنت الاطباق في درجة حرارة 25 ± 2 م لمدة اربعة ايام. فحصت الاطباق تحت المجهر وشخص الفطر الى مستوى النوع وفقاً للصفات التي ذكرها Parmeter وWhitney (1970).

تحضير المستخلص الكحولي لقشور الرمان:

حضر المستخلص بأخذ 250 غرام من مسحوق قشور الرمان المجففة ووضع في 500 مل كحول ايثلي تركيز 96% داخل قناني زجاجية سعة 1 لتر. وضعت القناني الحاوية على المزيج في هزاز كهربائي لمدة 24 ساعة. بعد ذلك رشح المستخلص عبر قماش الململ للتخلص من الاجزاء الصلبة قبل اخضاعها لعملية طرد مركزي بسرعة 3000 دورة بالدقيقة لمدة 10 دقائق بعدها اخذ الراشح واهمل الراسب. بعد ذلك حفظ المستخلص بشكل صلب بعد اجراء عملية تبخير المذيب من خلال وضع الراشح داخل فرن كهربائي لمدة اربعة ايام على درجة حرارة 40 م وكانت كمية المستخلص التي تم الحصول عليها 13 غم، حيث تم التخلص من وجود الكحول و الابقاء على راسب المستخلص فقط.

اختبار فعالية مستخلص قشور الرمان في تثبيط نمو الفطر *R. solani*.

اختبرت التراكيز 5 و 10 و 15 و 20 ملغم/مل للمستخلص ضد الفطر *R. solani*. اضيفت تراكيز المستخلص الى الوسط الغذائي PDA المعقم وقيل التصلب بدرجة حرارة 45 م تقريباً. بعد ذلك صب الوسط الغذائي المعامل بتراكيز المستخلص كل تركيز على حده في اطباق سعة 9 سم وبثلاثة مكررات لكل تركيز. اما معاملة المقارنة فقد احتوت على الوسط الغذائي فقط. بعد تصلب الوسط في الاطباق زرع مركز كل طبق بقرص قطره 0.5 ملغم اخذ من حافة مستعمرة الفطر *R. solani* بعمر ثلاثة ايام. اخذت النتائج بعد امتلاء طبق المقارنة وذلك بحساب متوسط قطرین متعامدين لكل مستعمرة ومنه حسبت النسبة المئوية للتثبيط حسب المعادلة: $\% \text{ للتثبيط} = \frac{(أ - ب)}{أ} \times 100$

أ = متوسط نمو مستعمرة الفطر في المقارنة

ب = متوسط نمو مستعمرة الفطر في المعاملة

نفذت التجربة وفق التصميم تام التعشبية (CRD) وبأقل فرق معنوي 0.05 (الراوي وخلف الله، 1980).

اختبار فعالية المستخلص الكحولي لقشور الرمان والمبيد الحيوي البايوكونت في تثبيط نمو الفطر *R. solani* في البيت الزجاجي.

اقتصر استخدام العامل الاحيائي بايوكونت للمقارنة بفعالية المستخلص الكحولي لقشور ثمار الرمان و ذلك عملا بتوجه البحوث العلمية باتجاه استخدام أمينة للبيئة، ملئت اصص بلاستيكية سعة 0.5 كغم معقمة بمحلول هاييوكلورات الصوديوم بخليط من تربة مزيجية و يتموس بنسبة 2 : 1 معقم بالمؤصدة ثلاث مرات تحت درجة حرارة 121 م وضغط 1.5 كغم / سم² لمدة ساعة ونصف وبفاصل زمني 48 ساعة لكل مرة. اضيف المبيد الحيوي البايوكونت بمعدل 0.5غم لكل اصيص قبل يومين من التلويت بلقاح الفطر الممرض *R. solani* المنمى على بذور الدخن بعمر 14 يوم بمعدل 0.5% وزن: وزن، رطبت الأصص بماء مقطر معقم وغلفت بأكياس بولي ايثيلين مثقبة وزرعت البذور بعد يومين من التلويت بالفطر الممرض وللمقارنة استعملت تربة معقمة فقط. زرعت بذور القطن المعقمة سطحيا بمحلول هاييوكلورات الصوديوم 1% في تربة الأصص وفق المعاملات 1- زراعة بذور معقمة في تربة معقمة. 2- زراعة بذور معقمة في تربة ملوثة بالفطر الممرض. 3- زراعة بذور معقمة في تربة ملوثة بالفطر الممرض ومضاف لها المبيد الحيوي البايوكونت. 4- زراعة بذور معقمة في تربة ملوثة بالفطر الممرض ومضاف لها 50مل من محلول مستخلص قشور الرمان بتركيز 20ملغم/مل. حسب النسبة المئوية لموت البادرات قبل البزوغ بعد 7 يوم من الزراعة في تربة الأصص وحسبت النسبة المئوية لموت البادرات بعد البزوغ بعد 15يوم وحسب الوزن الطري والجاف بعد 30يوم من الزراعة واتبع التصميم التام التعشبية وبواقع ثلاثة اصص لكل معاملة.

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص الفطر *R. solani*

أظهرت نتائج العزل من بادرات القطن المصابة الى وجود الفطر *R. solani* حيث ظهر نمو أبيض في بداية الأمر تحول الى اللون البني الداكن بتقدم عمر المستعمرة. كما ظهرت الخيوط الفطرية مقسمة بحواجز مستعرضة وتفرع الغزل الفطري بزوايا قائمة تقريباً مع وجود تخرص واضح في مناطق التفرع. اظهرت هذه العزلة قدرتها على تكوين الخلايا البرميلية وكونت اجسام حجرية صغيرة مستديرة الشكل ذات لون بني داكن. تتطابق هذه الصفات مع الصفات التي ذكرها Parmer و Whitney (1970).

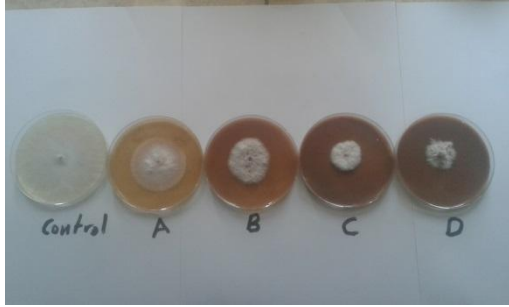
اختبار فعالية مستخلص قشور الرمان في تثبيط نمو الفطر *R. solani*.

هنا نود ان نبين انه لم يتم اجراء اختبار لقابلية عزلة الفطر على الاصابة، و ذلك كون الفطر كان مصاحباً لبادرات النبات الميتة مما يدل على قابليته على الاصابة، فضلا عن انه توجد معاملة مقارنة تتضمن الفطر الممرض فقط و التي من خلالها معرفة قابلية الفطر على الاصابة .

بينت نتائج التجربة الفعالية التثبيطية لمستخلص قشور ثمار الرمان الكحولي وفي جميع التراكيز بالمقارنة مع معاملة (الشاهد) المقارنة التي لم يضاف لها المستخلص شكل رقم (1) . بلغت النسب المئوية لتثبيط نمو الفطر الممرض 42، 54، 72، 75% بالتتابع بتأثير سمية التراكيز 5، 10، 15، 20ملغم/مل بالتتابع قياسا بمعاملة المقارنة التي بلغت فيها نسبة التثبيط 0% جدول رقم (1).

ان الفعالية التثبيطية لمستخلص قشور الرمان الكحولي يمكن ان يعود الى ان قشور ثماره غنية بالكثير من المركبات النباتية الطبيعية كالفينولات والتانينات والفلافونات ذات الفعالية التثبيطية العالية لنمو الفطريات والبكتريا (Negi و Jayaprakasha، 2003، Vasconcelos، وآخرون، 2003، Supayang، وآخرون، 2005، Alzoreky، 2009، Dahham وآخرون، 2010، Moussa، وآخرون، 2011، Neelam و Singh، 2012، Hajoori، وآخرون، 2014). اذ ان هذه المركبات قد تمنع تكوين الجدار الخلوي لخلايا الكائن الحي او تمنع التخليق الحيوي لبعض البروتينات الاساسية، كما قد تقوم بتمزيق الحامض النووي DNA وكذلك تغيير وظائف أغشية الخلايا (Tyler وآخرون، 1988، العنزي، 2004).

جدول رقم (1). فعالية* مستخلص قشور الرمان في تثبيط

نمو الفطر *R. solani*.

التركيز ملغم/مل	معدل النمو الفطري/سم	% للتثبيط
0	9	0
5	* 5.2	42
10	4.1	54
15	2.5	72
20	2.2	75
(%5) l.s.d.	0.16	

* كل رقم في الجدول معدل لثلاثة ارقام

شكل رقم (1) فعالية المستخلص الكحولي لقشور الرمان في تثبيط نمو الفطر *R. solani*. A تركيز 5% B تركيز 10% C تركيز 15% D تركيز 20% + المقارنة

اختبار فعالية المستخلص الكحولي لقشور الرمان والمبيد الحيوي البايوكونت في تثبيط نمو الفطر *R. solani* في البيت الزجاجي.

تشير النتائج في جدول (2) الى فعالية كل من المستخلص الكحولي لقشور الرمان والمبيد الحيوي البايوكونت في خفض النسبة المئوية لموت البادرات قبل وبعد البزوغ، وفي زيادة كل من ارتفاع النبات والوزن الجاف للنبات، اذ تؤدي الاصابة بالفطر الى تأخر نمو البادرة ثم موتها (صورة رقم 1)، وقد تفوق المبيد الحيوي معنويًا في ذلك، اذ بلغت فيها النسبة المئوية لموت البادرات قبل وبعد البزوغ 29.2، 16.6 بالتتابع في حين بلغت 38.3، 33.3 بالتتابع في معاملة المستخلص الكحولي لقشور الرمان قياسًا بمعاملة المقارنة التي اعطت 62.5، 45.8 بالتتابع. كما احدثت كل من المعاملتين زيادة معنوية في ارتفاع النبات وفي الوزن الجاف للنبات قياسًا بمعاملة المقارنة. فقد اظهرت معاملة المبيد الحيوي البايوكونت تفوقًا معنويًا واضحًا، اذ بلغ فيها ارتفاع النبات والوزن الجاف للنبات 15.8 سم، 475 غم بالتتابع في حين اعطت معاملة المستخلص الكحولي لقشور الرمان 12.9 سم، 411 غم بالتتابع قياسًا بمعاملة المقارنة التي اعطت 9.2 سم، 288 غم بالتتابع.

ان فعالية المبيد الحيوي البايوكونت الذي مادته الفعالة الفطر *T.harzianum* ضد الفطر *R.solani* يمكن أن يعزى الى الآليات التي يمتلكها الفطر *T. harzianum* كالتطفل الفطري وذلك لنموه إلى جنب الخيوط الفطرية للفطر الممرض والالتفاف حولها وتحليل جدرانها والتطفل على محتوياتها، وإنتاج المضادات الحياتية التي تؤثر بشكل سلبي على نمو المسبب المرضي، وتثبيط انزيمات المسبب المرضي مثل Chitinases و glucanases والتنافس مع المسبب المرضي على المكان والمواد المغذية، كما يعمل على تحفيز مقاومة العائل، اذ يحفز النبات على انتاج البروتينات التي لها علاقة بالأمراضية وذات التأثير المباشر او غير المباشر في المسبب المرضي (Hadar وآخرون، 1979 و Elad، 1980 و Goldman وآخرون، 1994 و Harman، 2000 والسامرائي، 2002 و Howell، 2003 و Holmes وآخرون، 2004 و Barakat وآخرون، 2007 و عبود وصالح، 2006، Karsa وآخرون، 2010).

جدول رقم (2) فعالية المستخلص الكحولي لقشور الرمان والمبيد الحيوي البايوكونت في مكافحة الفطر *R.solani*.

المعاملة	% موت البادرات قبل البزوغ	% موت البادرات بعد البزوغ	ارتفاع النبات (سم)	الوزن الجاف للنبات (mg)
Control	0	0	16.3	509
<i>R.solani</i>	62.5	45.8	* 9.2	288
K+ <i>R.solani</i>	38.3	33.3	12.9	411
B+ <i>R.solani</i>	29.2	16.6	15.8	475
LSD(0.05)	6.7	15.2	0.9	58.3

* كل رقم في الجدول معدل لثلاثة ارقام

K تمثل المستخلص الكحولي لقشور الرمان

B تمثل المبيد الحيوي البايوكونت

اما فعالية المستخلص الكحولي لقشور الرمان ضد الفطر الممرض يمكن ان يعزى الى المركبات النباتية الطبيعية كالفينولات والتانينات والفلافونات والاحماض العضوية المثبطة لنمو الاحياء المجهرية والتي يحتويها المستخلص الكحولي لقشور ثمار الرمان (Jayaprakasha و Negi، 2003، Vasconcelos وآخرون، 2003، Supayang وآخرون، 2005، Hajoori، 2012، Singh و Neelam، 2011، Moussa وآخرون، 2010، Dahham وآخرون، 2009، Alzoreky وآخرون، 2014).



صورة رقم (1) A- نبات سليم

B- نبات مصاب

المصادر

1. جبر، كامل سلمان جبر، ذياب عبد الواحد فرحان واحمد حميد رشيد. 2008. تقويم كفاءة بعض عوامل المكافحة الإحيائية والمبيد Beltanol ضد الفطرين *Rhizoctonia solani* ، *Fusarium oxysporum* المسبب لتعفن بذور وموت بادرات الرقي . مجلة العلوم الزراعية العراقية 39 (2) : 68 – 78.
2. العنزي، مهدي عبدالحسن كريم، 2004. تأثير المستخلصات الخام لنبات الجرجير *Eruca sativa M* في نمو بعض الجراثيم الممرضة. رسالة ماجستير. جامعة بغداد – كلية العلوم.
3. عبود ، هادي مهدي وحمود مهدي صالح. 2006. تحفيز الفطرين *Pacilomyces lilcanus* و *harzianum* واستخدامها كمبيدين إحيائيين . المؤتمر العربي التابع لعلوم وقاية النبات. 9 – 23 . تشرين الثاني/ نوفمبر . دمشق . سوريا.
4. السامرائي، فالح حسن سعيد. 2002. تأثير عزلات الفطر *Trichoderma spp* في إنبات بذور ونمو شتلات النارنج. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد.
5. Alzoreky NS (2009) Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum L*) fruit peels. *Int J Food Microbiol.*13:24–28.
6. Barakat، R. M.، F. AL-Mahareeq، M. S. Ali shtayeh and M. I. Al-Masri. 2007. Biological control of *Rhizoctonia solani* by indl genous *Trichoderma spp*. *Isolates from Palestin. Hebron University Rese. J.* 3(1): 1-15.
7. Dahham S. S.، Ali M. N.، Tabassum H. and Khan M.2010. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum L.*). *American-Eurasian Journal Agricultural and Environmental Science*; 9: 273-281.
8. Goldman، G. H.، C. Hayes and G. E. Harmun. 1994 .Moleclar and cellular biology of biocontrol by *Tirchoderma spp*. *Trends Biotechnol.* 12: 478-482.
9. Hadar، Y.I .Chet and Y. Henis .1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *T. harzianum*. *Phytopathology* 69:64-68.
10. Hajoori M.، Naik M.، Naik K. and Desai S.2014. Evaluation of antimicrobial activity of *Punica granatum* peel extracts using different solvent system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Methods*; 4: 26-31.
11. Harman، G.E. 2000. Myths and Dogmas of Biological Changes is perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* strain T.22. *Plant Dis. Report.* 84:377-393.

12. Holmes, Keith A., Hans-Josef Shores Sarah E. Thomas, Harry C. Evans and Gray J. Samuels. 2004. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of south America *Mycological progress* 3(2) : 199 – 210.
13. Howell, C. R. .2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the Biological control of plant disease: the history and evolution of current concepts . *Plant Di.* 87(1) : 1 -9.
14. Karsa , E. Mostafa; R.Z Mohammad and H.S Halel. 2010. Transformation of potato (*Solanum tuberosum* CV. savalan) by chitinase and B-1.3- glucanase genes of mycoparasitic fungi towards improving resistance to *Rhizoctonia solani* AG-3: *Iran Journal of Bio - technology* 8 : 73 – 81.
15. Moussa A. M., Emam A. M., Diab Y. M., Mahmoud M. E. and Mahmoud A. S. 2011. Evaluation of antioxidant potential of 124 Egyptian plants with emphasis on the action of *Punica granatum* leaf extract on rats. *International Food Research Journal*; 18: 535-542.
16. Neelam and Singh D. 2012. *Punica granatum*: A review on pharmacological and therapeutic properties. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*; 3: 1240-1245.
17. Negi PS, Jayaprakasha GK (2003) Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. *J Food Sci.* 68:1473–1477.
18. Supayang PV, Treechada S, Surasak L, Thanomjit S, Tetsuya I, Takeshi H (2005) Inhibitory effect of active compounds from *Punica granatum* pericarp on verocytotoxin production by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 157: H 7: *J. Health Science.* 51: 590-596.
19. Tyler, V. E. , Lynn, R. B. and James, E. R. (1988). *Pharmacognosy.* 9th ed . Lea and Febiger Philadelphia, P. A. USA.
20. Vasconcelos LCD, Sampaio MCC, Sampaio FC, Higino JS (2003) Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidiasis associated with denture stomatitis. *Mycoses.* 46(5-6): 192-196.