Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Evaluation of the antifungal effect of Pomegranate (*Punica granitum* L.) cultivar Meles Saveh on the fungus that causes rotting of Pomegranate fruit infected with neck worm (Ectomyelois ceratoniae)

Azra Ataei Azimi Associate Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran **(Corresponding author).** Baharana1395@gmail.com

Babak Delnavaz Hashemloian Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Agriculture, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran. hashemloian1343@gmail.com

Reza Rezakhanlou Assistant Professor, Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran. reza.rezakhanlou@gmail.com

Abstract

Purpose: The purpose of this research is to answer the question, which composition of pomegranate fruit (L. Punica granitum) of the variety Meles Saveh causes the growth or prevents the growth of the fungus that causes fruit rot infected with neck worm (Ectomyelois ceratoniae)

Materials and methods: In this research, different parts of pomegranate including fruit skin, seeds, pomegranate juice and pomegranate paste of Meles Saveh variety were prepared. The phenolic and alkaloid content of all parts were extracted and measured using solvents such as water, alcohol, and acetone. Aspergillus fungus (Asperjillus Sp.) was isolated and identified from the decay site infected with neck worm. The effect of aqueous and alcoholic extracts of pomegranate fruit components on this fungus was studied.

Findings: The results showed that pomegranate juice and dry paste have the most alkaloids and phenols. The effect of aqueous and alcoholic extracts on Aspergillus mushroom showed that aqueous and alcoholic extracts prevent the growth of this fungus, but the inhibitory effect of alcoholic pericarp is the most.

Conclusion: Meles Saveh pomegranate fruit components are rich in alkaloid and phenolic compounds. Antifungal effect of aqueous and alcoholic extracts of fruit pericarp can prevent the growth of fungus.

Keywords: Pomegranate Meles Saveh variety, Phenol, Alkaloid, Aspergillus, Pericarp, Fungus, Neck worm, Fruit rot, Ectomyelois ceratoniae.

Received: 2023/10/10 ; **Revised:** 2023/11/20 ; **Accepted:** 2023/12/01 ; **Published online:** 2023/12/26

Cite: Ataei Azimi, A., Delnavaz Hashemloian, B. & Rezakhnlou, R. (2023). Evaluation of the antifungal effect of Pomegranate (*Punica granitum* L.) cultivar Meles Saveh on the fungus that causes rotting of Pomegranate fruit infected with neck worm (Ectomyelois ceratoniae). *Applied Biology*, 13(4), p. 21-36.

Article type: Research Article © the authors **Publisher:** Qom Islamic Azad University

بیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۲۵۳۸-۳۴۳۴
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

ارزیابی اثر ضد قارچی انار (*Punica granitum* L.) رقم ملس ساوه بر قارچ عامل پوسیدگی میوه انار آلوده به کرم گلوگاه

عذرا عطائی عظیمی دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (**نویسنده مسئول**). baharana1395@gmail.com
بابک دلنواز هاشملویان دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده کشاورزی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران. hashemloian1343@gmail.com
رضا رضاخانلو استادیار، گروه کشاورزی، دانشکده کشاورزی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران. reza.rezakhanlou@gmail.com

چکیده

هدف: هدف پژوهش حاضر پاسخ به این سوال است که کدام ترکیب میوه انار (*Punica granitum* L.) رقم ملس ساوه باعث رشد یا جلوگیری از رشد قارچ عامل پوسیدگی میوه آلوده به کرم گلوگاه می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، اجزای مختلف انار شامل پوست میوه، دانه، آب انار و رب انار رقم ملس ساوه تهیه شد. محتوای فنلی و آلکالوئیدی کل بخش‌ها با استفاده از حلال‌هایی مثل آب، الکل و استن، استخراج و اندازه‌گیری گردید. قارچ آسپرژیلوس (*Asperjillus Sp.*) از محل پوسیدگی آلوده به کرم گلوگاه جدا و شناسایی شد. اثر عصاره‌های آبی و الکلی اجزای میوه انار روی این قارچ مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که آب و رب خشک انار، بیشترین آلکالوئید و فنل را دارند. اثر عصاره‌های آبی و الکلی روی قارچ آسپرژیلوس نشان داد عصاره‌های آبی و الکلی مانع رشد این قارچ می‌شوند، ولی اثر بازدارنده الکلی پریکارپ از همه بیشتر است.

نتیجه‌گیری: اجزای میوه انار ملس ساوه سرشار از ترکیبات آلکالوئید و فنلی هستند. اثر ضدقارچی عصاره‌های آبی و الکلی پریکارپ میوه می‌تواند از رشد قارچ جلوگیری کند.

کلیدواژه‌ها: انار رقم ملس ساوه، فنل، آلکالوئید، آسپرژیلوس، پریکارپ، قارچ، کرم گلوگاه، پوسیدگی میوه.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۸ ؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۰۸/۲۹ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۹/۱۰ ؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۲/۱۰/۰۵

استناد به این مقاله: عطائی عظیمی، عذرا؛ دلنواز هاشملویان، بابک؛ رضاخانلو، رضا (۱۴۰۲). ارزیابی اثر ضد قارچی انار (*Punica granitum* L.) رقم ملس ساوه بر قارچ عامل پوسیدگی میوه انار آلوده به کرم گلوگاه. *بیولوژی کاربردی*، ۱۳(۴)، ص۲۱-۳۶.

ناشر: دانشگاه قم **© نویسندگان** **نوع مقاله: پژوهشی**

CC BY NC

۱. مقدمه

انار[1] گیاهی است درختی یا درختچه‌ای از تیره انار[2]، با میوه خوراکی، اغلب دارای چندین ساقه می‌باشد. ارقام زیادی از این گیاه در ایران وجود دارد که از نظر طعم و مزه میوه، اندازه، وزن و رنگ میوه و ترکیبات شیمیایی با هم متفاوت هستند و به همین جهت از نظر خواص هم متفاوت خواهند بود. رقم ترش و شیرین ساوه (ملس) یکی از ارقام تجاری و پر طرفدار است (۱). ترکیبات ثانوی زیادی مانند فنل‌ها شامل آنتوسیانین، تانن‌های هیدرولیز شونده و متراکم؛ و آلکالوئید، با خواص دارویی متنوع در این گیاه وجود دارد. گیاه انار، دارای فعالیت‌های زیستی مانند اثر ضدتوموری، ضدباکتریایی، ضداسهال، ضدقارچ و ضدزخم است. میوه انار، عصاره میوه، عصاره‌های پوست، روغن دانه و عصاره دانه، خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند (۲). بسیاری از آلکالوئیدها و فنل‌ها خاصیت ضد قارچی دارند (۳). عصاره‌های انار دارای خاصیت ضدمیکروبی هستند (۴). عصاره‌های متانولی پوست میوه انار، فعالیت ضدمیکروبی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس[3] و اپیدرمیس[4] و قارچ‌ها دارند (۵). ترکیباتی مانند تانن در گیاهان باعث رسوب پروتئین‌ها در غشاها و مرگ سلولی می‌شوند (۴). تانن‌ها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، نفتوکوئینون‌ها، منتول و منتون گیاهان مختلف ازجمله انار خواص ضدمیکروبی شناخته دارند (۶). عصاره متانولی پوست میوه انار، اثر بازدارنده روی میکروب‌هایی مثل *Listeria monocytogenes*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Yersinia enterocolitica*، دارد که پژوهشگران این اثر را به وجود ترکیبات فنلی در پوست انار نسبت داده‌اند (۷). آب میوه و پلی‌فنل‌های انار، خاصیت ضدویروسی داشته (۸) و روی کنترل ویروس آنفلونزا مؤثر بوده‌اند (۹). عصاره‌های انار خاصیت ضدقارچی دارند (۱۰) و این خاصیت به وجود فنل فراوان در این گیاه نسبت داده شده است. فنل‌ها از ترکیباتی هستند که می‌توانند از دیواره قارچ بگذرند و باعث مرگ قارچ شوند (۱۰، ۴). قارچ‌های بیماری‌زا در انسان که مداوای آن‌ها ۱ تا ۲ سال طول می‌کشد، با عصاره هگزانی ساقه انار از بین می‌روند و عصاره هیچ گیاهی، قوی‌تر از عصاره انار نیست (۱۰). نوعی فنل به نام پونیکالاژین جدا شده از پوست میوه انار، به شدت مانع رشد برخی قارچ‌ها مانند آسپرژیلوس و کاندیدا آلبیکانز می‌شود (۱۱). آسپرژیلوس‌ها از آسکومیست‌های ناقص، از فراوان‌ترین قارچ‌ها در

1. Punica granitum L.
2. Punicaceae
3. Staphylococcus aureus
4. S.epidermis

دنیا هستند که نقش‌های متفاوتی در زندگی انسان دارند (۱۲). آسپرژیلوس نیگر[1] یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌ها در بیوتکنولوژی است. از این قارچ برای تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده مواد مختلف و تولید تجاری اسید سیتریک استفاده می‌شود (۱۲،۱۳). کاندیدا آلبیکانز نوعی قارچ مخمری است که سبب تخریب بافت دهانی می‌شود و خوردن انار می‌تواند باعث نابودی این قارچ و تأمین سلامت دهان شود (۱۱،۱۴، ۱۵). ثابت شده است که عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی پوست میوه انار، اثر بازدارندگی خوبی روی رشد بسیاری از قارچ‌ها دارند (۱۱).

انار ملس ساوه یکی از ارقام بومی و پرکشت بوده که به دلیل کیفیت عالی، طعم و مزه و آنتی اکسیدان بالا، از ارقام صادراتی می‌باشد. این رقم انار بازار اقتصادی مناسبی داشته و سودآوری زیادی دارد. این رقم بسیار دیر رس بوده و زمان برداشت محصول آن اواخر مهرماه تا اواسط آبان است (۱۶). کرم گلوگاه انار[2] آفت کلیدی و از عوامل مهم کاهش محصول انار در ایران است. یکی از مشکلات این رقم، آلودگی با کرم گلوگاه و پوسیدگی با قارچ و باکتری در محل لانه‌گزینی است که باعث سرایت پوسیدگی و از بین رفتن کل میوه می‌شود (۱۷). در این پژوهش، فنل‌ها و آلکالوئیدهای اجزای مختلف انار رقم ملس ساوه، استخراج و میزان آن اندازه‌گیری شد. همچنین اثر عصاره‌های آبی و الکلی، فنل‌ها و آلکالوئیدهای اجزای مختلف این رقم انار ملس ساوه بر قارچ آلوده‌کننده میوه، مورد مطالعه قرار گرفت. هدف پژوهش حاضر این بود که مشخص شود کدام ترکیب میوه باعث رشد یا جلوگیری از رشد این قارچ در میوه می‌شود.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. ماده گیاهی

انار رقم ملس ساوه، از مرکز تحقیقات انار شهرستان ساوه تهیه، پوست میوه و بخش خوراکی (دانه‌های آبدار) جدا شدند. از بخش خوراکی، آب انار گرفته شد و آب و دانه انار جدا گردید. پوست میوه و دانه‌های انار در سایه، و در دمای اتاق خشک شدند. بعد از آن برای خشک شدن کامل، ۱۲ ساعت در اون ۶۰ درجه گذاشته شدند.

۲-۲. آب انار

ده کیلو میوه انار را پوست کنده و دانه‌های آبدار و خوراکی آن از پوست جدا شد. آب انار از طریق

1. A.niger
2. Ectomyelois ceratoniae

له کردن دانه‌های آبدار و صاف کردن، آماده شد. از ده کیلو انار تقریباً ۵/۵ لیتر آب انار به دست آمد.

خشک کردن آب انار: ۲ لیتر آب انار در سینی‌های استیل برای خشک شدن در آفتاب قرار داده شد. آب انار بعد از دو هفته در آفتاب روزانه مرداد ماه (۳۵-۴۰ درجه سلسیوس) و ۴۸ ساعت قرار گرفتن در اون ۶۰ درجه، خشک شد. از خشک شدن ۲ لیتر آب انار ۲۲/۰۶۲ گرم آب انار خشک به دست آمد.

۲-۳. رب انار و خشک کردن آن

رب انار از آب انار جوشانده و تغلیظ شده به دست آمد. ۳ لیتر آب انار در قابلمه استیل ۴ لیتری به مدت ۸ ساعت جوشانده شد تا حدود ۳۱۵ میلی‌لیتر رب انار غلیظ به دست آمد. رب انار به مدت یک هفته در سینی استیل در آفتاب روزانه مرداد ماه (۳۵-۴۰ درجه سلسیوس) و ۴۸ ساعت در اون ۶۰ درجه قرار گرفت، تا کاملاً خشک شد. از خشک شدن رب انار ۲۸ گرم ماده خشک بدست آمد.

۲-٤. عصاره آبی

روی ۵ گرم از پودر پوست، دانه، آب انار و رب انار جداگانه در یک ارلن مایر، ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد و بعد از ۲ ساعت جای گرفتن در حمام آب گرم (بن ماری) ۶۰ درجه سلسیوس، با کاغذ صافی، صاف گردید. این عصاره با دستگاه روتاری تبخیر در خلاء خشک، و برای اضافه کردن به محیط کشت قارچ استفاده شد.

۲-۵. عصاره الکلی

روی ۵ گرم از پودر هر یک از اجزای پوست میوه، دانه، آب انار و رب انار جداگانه در یک ارلن مایر، ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶% ریخته شد و بعد از ۲ ساعت در حمام آب گرم (بن ماری) ۶۰ درجه سلسیوس، صاف گردید. این عصاره با دستگاه روتاری تبخیر در خلاء خشک و برای اضافه کردن به محیط کشت قارچ استفاده شد.

۲-٦. استخراج آلکالوئید از اجزای مختلف انار

روی ۸ گرم از ماده خشک هر بخش از میوه انار (پوست، دانه، آب انار و رب انار)، ۲۰۰ میلی‌لیتر الکل اتانول ۹۶ درصد ریخته و بعد از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در حمام آب گرم (بن ماری) ۳۰ درجه سلسیوس، با کاغذ صافی واتمن شماره (۱) صاف شد. تفاله روی کاغذ صافی دوبار با ۵۰ میلی‌لیتر الکل شستشو شد. عصاره اتانولی، در دمای اتاق خشک گردید. عصاره خشک شده، با ۱۰۰ میلی‌لیتر دی اتیل اتر و ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۵ درصد به خوبی مخلوط و هم زده شد.

بخش اسیدی و اتری این مخلوط با قیف جداکننده (دکانتور) جدا گردید. به بخش اتری دوباره ۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۵ درصد اضافه و بخش اسیدی دوباره جدا شد. این فرآیند یک بار دیگر تکرار شد. بخش اسیدی مانده از هر سه بار، مخلوط و در مراحل بعدی استفاده شد. pH بخش اسیدی با سود (NaOH) ۰/۵ نرمال به بالاتر از ۱۰ رسانده شد. بخش قلیایی بدست آمده (pH>10) ابتدا با ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم، مخلوط و خوب همزده شد و سپس به‌وسیله دکانتور، کلروفرم، جدا و عمل فوق بار دیگر با ۵ میلی‌لیتر کلروفرم انجام شد. عصاره کلروفرمی به دست آمده محتوی آلکالوئید بود. عصاره کلروفرمی به دست آمده، در هوای آزاد تبخیر شد و وقتی حدود ۰/۱ میلی‌لیتر از آن باقی ماند، در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، حل شد و با خواندن جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۵۴ نانومتر و از روی منحنی استاندارد، آلکالوئید کل به دست آمد. برای رسم منحنی استاندارد و سنجش الکالوئیدها، از به دست آوردن جذب نوری مقادیر ده غلظت (۰- ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) آلکالوئید پزدوافدرین (قرص پزدوافدرین هیروکلراید ۳۰ میلی‌گرمی خدمات دارویی رضوی)، در طول موج ۲۵۴ نانومتر، استفاده شد (۱۸).

۲-۷. عصاره‌های فنلی

۵ گرم عصاره خشک هر بخش از میوه انار شامل رب، آب، دانه و پوست میوه (پریکارپ) انار، با ۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم مخلوط گردید. درب آن‌ها با فویل، بسته شد و به مدت ۳ ساعت در حمام آب گرم (بن ماری) ۴۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس مخلوط حاصل، با کاغذ صافی واتمن صاف شد. رسوبات در سه نوبت با ۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم شستشو داده شد. بخش کلروفرمی جدا شده، حاوی لیپید، رنگریزه کاروتنوئید و آلکالوئید بود که دور ریخته شد. تفاله باقیمانده، خشک و با ۵۰ میلی‌لیتر مخلوط ۵۰ درصد متانول (متانول- آب) مخلوط، و بعد از ۳ ساعت قرار گرفتن در بن ماری۶۰ درجه، صاف شد. عصاره به دست آمده، محتوی فنل بود. اندازه‌گیری فنل کل با معرف فولین- سیوکالتوس انجام شد (۱۹). در این روش ۱۰ لوله آزمایش، انتخاب و در هر یک ۱ میلی‌لیتر سدیم استات (۵ درصد با pH= ۵) و مقایر مختلف ۰/۵- ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول اسید گالیک ۰/۱ درصد، ۰/۲۵ میلی‌لیتر معرف فولن- سیوکالتیوس (مولار) ریخته، حجم هر لوله با کربنات سدیم (۲۰ درصد) به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس جذب، با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۴۳ نانومتر اندازه گرفته شد و براساس مقادیر گالیک اسید (مرک) و جذب منحنی استاندارد (کالیبره) به دست آمد. برای تعیین فنل کل اجزای مختلف انار، ۱ میلی‌لیتر از فنل استخراجی هر اندام با ۱ میلی‌لیتر سدیم استات، ۷/۷۵ میلی‌لیتر سدیم کربنات و ۰/۲۵ میلی‌لیتر فولن- سیوکالتیوس در لوله

مخلوط، و جذب در طول موج ۷۴۳ نانومتر به دست آمد و با استفاده از منحنی استاندارد، فنل کل در هر اندام محاسبه شد.

۲-۸. تهیه محیط کشت قارچ

برای تهیه محیط کشت قارچ از سیب‌زمینی و آگار استفاده شد. ۱۰۰ گرم سیب‌زمینی کوچک آب‌پز پوست کنده و له، با قرار دادن به مدت ۴۸ ساعت در اون ۸۰ درجه سلسیوس کاملاً خشک شد. ۲ گرم از سیب‌زمینی خشک شده با ۰/۴ گرم آگار و ۵ میلی‌گرم آنتی بیوتیک آموکسی سیلین مخلوط و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محیط کشت آماده ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شد.

۲-۹. کشت و خالص‌سازی قارچ (پاساژ)

بعد از سفت شدن محیط کشت اتوکلاو شده، قارچ روی آن کشت شد. برای کشت قارچ، با یک سوآپ از گلوگاه آلوده انار، اسپورهای سیاه قارچ را برداشته و در ده نقطه با فاصله تقریباً برابر، روی محیط کشت شد. بعد از ۴۸ ساعت، با سوآپ اسپورهای قارچ از محیط کشت برداشت و روی محیط کشت جدید منتقل گردید. با دو بار پاساژ، قارچ خالص با اسپورهای سیاه و بدون آلودگی‌های باکتریایی و قارچی به دست آمد. با مطالعات ظاهری و میکروسکوپی مشخص شد که احتمالاً این قارچ آسپریلوس نایجر است.

۲-۱۰. بررسی تاثیر عصاره‌های آبی و الکلی در محیط کشت بر قارچ آسپرژیلوس[1]

۵ گرم از عصاره خشک آبی، الکلی، فنل و آلکالوئید هر بخش از انار را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده (محلول ۵۰%) و برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها روی قارچ، از این محلول مقادیر ۰، ۱، ۳ و ۵ میلی‌لیتر برداشته و با محیط کشت قارچ به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. غلظت هر عصاره در محیط شامل ۰، ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بعد از اتوکلاو و سرد شدن محیط کشت، اسپور قارچ با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و با سوآپ استریل روی ده نقطه از محیط قارچ کشت شد. نتایج بعد از ۴۸ ساعت، با رشد قارچ در تیمار صفر مقایسه شد.

۲-۱۱. طرح آزمایشی و تجزیه آماری داده‌ها

آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. برای

1. Asperjillus Sp.

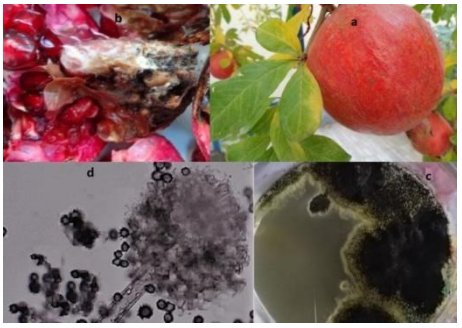
تجزیه آماری و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵ درصد، از نرم‌افزار Minitab استفاده شد.

۳. نتایج

انار رقم ملس ساوه یکی از ارقام بومی ایرانی است که میوه‌های آن کروی و درشت با پوست میوه ضخیم می‌باشد (شکل ۱a). دانه‌ها آبدار و درشت و بخش چوبی آن نرم و کوچک است. طعم، ترش- شیرین است. بررسی‌ها نشان داد که کرم گلوگاه این رقم را آلوده می‌کند. در محل آلودگی میوه، پوسیدگی ایجاد می‌شود که یکی از عوامل پوسیدگی قارچی با اسپورهای سیاه بود (شکل ۱b). بررسی‌های میکروسکوپی ریسه‌ها و اسپورهای سیاه نشان داد که ریسه‌ها دیواره‌دار، اسپورها خاردار و تیره می‌باشند. رنگ سیاه قارچ در زمان تشکیل اسپور (کنیدیوسپور)، وزیکول انتهایی کنیدیوفور و استیگمات‌های روی آن، ریسه‌ها و اسپورهای سیاه و خاردار پوسیدگی گلوگاه انار نشان داد که احتمالاً این قارچ آسپرژیلوس نایجر[1] باشد (شکل ۱d).

۳-۱. جدا کردن قارچ آسپرژیلوس از میوه انار و کشت در محیط سیب‌زمینی- آگار

با کشت قارچ آسپرژیلوس جدا شده از محل پوسیدگی گلوگاه انار روی محیط کشت محتوی عصاره سیب‌زمینی و آگار، بعد از ۴۸ ساعت مشخص شد که این قارچ با سطح وسیع و یکنواخت رشد می‌کند. محیط سیب‌زمینی آماده شده برای رشد قارچ آسپرژیلوس مناسب بود. این قارچ به خوبی در این محیط رشد کرد (شکل ۱c).



شکل ۱- میوه و قارچ آلوده‌کننده میوه انار ملس ساوه- a: میوه انار رقم ملس ساوه، b: جایگاه آلودگی کرم گلوگاه و پوسیدگی و رشد قارچ، c: رشد قارچ روی محیط سیب زمینی-آگار و d: تصویر میکروسکوپی اسپورهای خاردار و کنیدیفور قارچ آسپرژیلوس

1. A.niger

۳-۲. محتوای آلکالوئید و فنل تام

آنالیز واریانس‌های محتوای آلکالوئید اجزای مختلف انار رقم ملس ساوه، اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد را بین اجزاء نشان داد. مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون توکی در سطح ۰/۰۵ مشخص کرد که میزان آلکالوئید آب انار از سایر اندام‌ها بیشتر است. یافته‌های حاصل از سنجش آلکالوئید در هر بخش از میوه انار رقم ملس ساوه نشان داد که همه بخش‌ها دارای ۱/۱۵ تا ۱۱/۹۲ میلی‌گرم آلکالوئید در ۱۰۰ گرم عصاره خشک هستند، ولی آب و رب انار به ترتیب با ۱۱/۹۲ و ۱۱/۸۳ میلی‌گرم بیشترین آلکالوئید و پریکارپ و دانه به ترتیب با ۷/۵۶ و ۱/۱۵ درصد، کمترین آلکالوئید را دارند (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین آلکالوئید و فنل کل برحسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک (mg/100gdw) در اجزای مختلف انار

بخش	آلکالوئید (mg/100g)	فنل (mg/100g)
آب انار	۱۱/۹۲ ± ۰/۰۱	۲۱۷/۶ ± ۲/ ۹۳
رب انار	۱۱/۸۳ ± ۰/۰۳۰	۲۱۰/۱۶ ± ۵/۴۴
دانه	۱/۱۵ ± ۰/۰۰۱	۱۵/۸ ± ۱۰/۴
پریکارپ	۷/۵۶ ± ۰/۰۰۲	۳۰/۴ ± ۶/۷۶

مقایسه آنالیز آماری با آزمون توکی در حد ۰/۰۱ نشان داد که تفاوت آلکالوئید در بین همه بخش‌ها به جز آب و رب انار معنی‌دار بوده و بیشترین تفاوت، بین دانه با آب انار بود. آلکالوئید رب و آب انار خیلی بیشتر از پریکارپ و دانه بود (جدول ۱). آنالیز واریانس‌های محتوای فنل اجزای مختلف، وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ را نشان داد. مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون توکی در سطح ۰/۰۵ مشخص کرد که میزان فنل بخش‌های میوه، با یکدیگر دارای اختلاف معنی‌دار هستند. میزان فنل موجود در رب و آب انار (در عصاره خشک) با اختلاف معنی‌دار نزدیک به هم ولی با تفاوت معنی‌دار، بسیار بیشتر از دانه و پریکارپ بود. یافته‌های حاصل از سنجش فنل کل در هر اندام انار رقم ملس ساوه نشان داد که همه اجزاء دارای مقادیر زیادی فنل نسبت به وزن خشک هستند، ولی آب (۲۱۷/۶ mg/100g) و رب (۲۱۰/۱۶ mg/100g) با کمی تفاوت، ولی با اختلاف معنی‌دار، بیشترین و دانه انار (۱۵/۸mg/100g) کمترین محتوای فنل را دارند (جدول ۱).

۳-۳. اثر عصاره‌های آبی و الکلی اجزای انار مخلوط با محیط کشت

۳-۳-۱. عصاره آبی

اثر عصاره‌های آبی بر رشد قارچ در جدول (۲) نشان داده شده است. یافته‌های جدول (۲) نشان

می‌دهد که در محیط کشت سیب‌زمینی با آب مقطر و بدون عصاره (شاهد)، میزان رشد قارچ عالی و همراه با پوشیده شدن سطح محیط به وسیله ۱۰ کلنی قارچ است. در محیط شاهد، میانگین قطر هر کلنی ۱۵ میلی‌متر بود، ولی در محیط کشت مخلوط با غلظت‌های ۰/۵، ۱/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، عصاره آبی پریکارپ، با افزایش غلظت تعداد کلنی‌ها به ترتیب کاهش و اندازه کلنی‌ها کوچک شد. در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، تعداد کلنی‌ها به ۴ عدد و قطر میانگین آنها به ۲/۷۶ میلی‌متر کاهش پیدا کرد. در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در همه تکرارها، رشد قارچ تقریباً متوقف شده بود. رشد قارچ در محیط محتوی عصاره آبی رب و آب انار در غلظت ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، تعداد کلنی‌ها مساوی شاهد، ولی در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با تفاوت معنی‌دار به ۸ کلنی کاهش یافت. در هر دو عصاره با افزایش غلظت قطر کلنی‌ها با تفاوت معنی‌دار کاهش داشت. اثر عصاره آبی دانه، کمی متفاوت بود. با افزایش غلظت تا ۱/۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر، تعداد کلنی‌ها مشابه شاهد، ولی میانگین رشد کلنی‌ها با اختلاف معنی‌دار، بیشتر از شاهد بود. در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کمی رشد کاهش یافت، ولی اختلاف آن با شاهد معنی‌دار نبود.

۳-۳-۲. عصاره الکلی

یافته‌های جدول (۲) نشان می‌دهد که اثر عصاره الکلی بر رشد قارچ شدیدتر است. با افزایش غلظت عصاره الکلی، تعداد کلنی‌های قارچ و اندازه آنها نسبت به شاهد، کاهش معنی‌دار داشت. بیشترین اثر بازدارنده مربوط به غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که در آن هیچ کلنی قارچ رشد نکرد.

جدول ۲- اثر عصاره‌های آبی و الکلی آب، رب، پریکارپ و دانه میوه انار بر قارچ آسپرژیلوس گلوگاه میوه انار

بخش میوه		عصاره آبی				عصاره الکلی			
	غلظت (mg/ml)	۰	۰/۵	۱/۵	۲/۵	۰	۰/۵	۱/۵	۲/۵
آب میوه	تعداد کلنی	۱۰a	۱۰a	۱۰a	۸b	۱۰a	۹ab	۵/۵c	۳d
	قطر کلنی (میلی‌متر)	۱۵/۱۱	۱۴/۱۵	۱۳/۲۴	۱۲/۵	۱۵/۱۱	۱۳/۲۳	۷/۲۵	۳/۴
رب میوه	تعداد کلنی	۱۰a	۱۰a	۱۰a	۸b	۱۰a	۹ab	۵cd	۳d
	قطر کلنی (میلی‌متر)	۱۵/۱۱	۱۴/۴۵	۱۳/۶	۱۲/۵۵	۱۵/۱۱	۱۳/۰۵	۷/۵	۳/۴
پریکارپ	تعداد کلنی	۱۰a	۹ab	۸b	۴dc	۱۰a	۸b	۳d	۰e
	قطر کلنی (میلی‌متر)	۱۵/۱۱	۱۳/۱۳	۸/۸۹	۲/۷۶	۱۵/۱۱	۱۲/۳۲	۴/۲	۰
دانه	تعداد کلنی	۱۰a	۱۰a	۱۰a	۹ab	۱۰a	۸b	۷cb	۴dc
	قطر کلنی (میلی‌متر)	۱۵/۱۱	۱۵/۹۵	۱۶/۴۹	۱۴/۷	۱۵/۱۱	۱۲/۵۳	۷/۵۶	۷

٤. بحث

٤-١. فنل و آلکالوئید

عدم تفاوت معنی‌دار محتوای آلکالوئید و فنل رب (حرارت دیده) و آب (حرارت ندیده) انار نشان داد که احتمالاً ترکیبات آلکالوئیدی و فنلی آب و رب انار مقاوم به دما بوده و با بالا رفتن دما تجزیه نمی‌شوند. محتوای فنل کل در رقم ملس ساوه انار، بالا و بین ۱۵/۸ درصد تا ۲۱۷/۶ درصد بود. فنل پریکارپ، به نتیجه پژوهشی که محتوای فنل کل در انار را ۲۳ درصد گزارش کرده (۵) نزدیک است، ولی فنل همه اجزای رقم ملس ساوه از گزارش عجمی و همکاران (۲۰۲۳) که میزان ترکیبات فنلی آن را ۰/۴۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم بیان کرده‌اند (۲۰)، خیلی بالاتر است. ملکشاهی و ولی‌زاده کاجی نیز در پژوهشی میزان فنل پریکارپ میوه چند رقم انار ازجمله انار رقم ملس را ۱۷۰-۱۱۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم میوه تر گزارش کرده‌اند (۲۱) که ۵/۶-۳/۶ برابر یافته‌های (۳۰/۴ میلی‌گرم) این پژوهش است. فنل آب انار خشک ۲۱۷/۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم (۲۱۷۶ /۰ درصد) بود و خیلی کمتر از گزارشی است که فنل کل آب میوه تازه ارقام ایرانی انار را بین ۷ تا ۹ درصد بیان کرده است (۵). از آنجا که با خشک کردن ۲ لیتر آب انار تازه، ۲۲/۰۶۲ گرم آب انار خشک به دست آمد، پس نسبت وزن خشک به آب میوه تازه، حدود ۱۱ برابر است. بر این اساس، ۶ /۲۱۷ میلی‌گرم فنل در ۱۰۰ گرم ماده خشک اگر بر ۱۱ تقسیم شود، مقدار فنل در ۱۰۰ گرم آب انار تازه ۱۹/۷۸ میلی‌گرم (۰/۱۹۷۸ درصد) درمی‌آید. آلکالوئید در همه اجزای رقم ملس ساوه وجود داشت، اما در رب (۱۱/۸۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) و آب انار (۱۱/۹۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) خشک شده بیشتر از دانه و پریکارپ بود. این نتایج با این گزارش که آلکالوئیدها بیشتر در پوست میوه (پریکارپ) وجود دارند (۲۲)، مطابقت ندارد. دانه، کمترین آلکالوئید و فنل را داشت.

٤-٢. اثر ضد قارچی

در آب، برگ‌ها، پوست آب انار، گل‌ها، میوه‌ها و دانه‌های گیاهان ترکیبات آلی زیادی مانند ترکیبات فنلی، آلکالوئید، اسانس، رنگیزه، آنزیم‌های هیدرولیزی، پروتئین و ایزوتیوسیانات تشکیل می‌شود که برخی از آن‌ها خاصیت ضدمیکروبی دارند. ترکیبات فنلی در چندین گروه تقسیم‌بندی می‌شوند و شامل فنل‌های ساده، پلی‌فنل‌ها (تانن‌ها)، آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها بوده و خواص دارویی مختلف مثل خاصیت ضدمیکروبی را به آن‌ها نسبت می‌دهند. بیش از ۸ هزار نوع فنل در گیاهان شناخته شده است (۲۳). پلی فنل‌ها (تانن‌ها) اثر ضد میکروبی و ضد قارچی قوی دارند (۲۴). ترکیبات زیادی در بسیاری از گیاهان شناخته شده‌اند که بر رشد بسیاری از باکتری‌ها و قارچ‌ها

مانند قارچ آسپرژیلوس اثر بازدارنده دارند (۲۵). از خواص ضد قارچی عصاره‌های انار، گزارش‌های زیادی در دسترس است. گفته شده که عصاره آبی پوست آب انار، دانه، برگ، پریکارپ (پوست میوه) و آب انار، فعالیت ضدباکتری و ضدقارچی دارند و رشد برخی قارچ‌ها را در محیط آزمایشگاهی مهار می‌کنند (۸،۳). یافته‌های این تحقیق هم نشان داد که عصاره‌های آبی و الکلی اجزای انار با مقادیر مختلف در محیط کشت، بازدارنده رشد قارچ آسپرژیلوس هستند و برخی در غلظت‌های کمی بالاتر، رشد قارچ را در محیط کشت متوقف می‌کنند.

به طور کلی اثر بازدارندگی عصاره‌های الکلی بالاتر از عصاره آبی بود که احتمالاً ناشی از وجود ترکیباتی مانند آلکالوئیدها و فنل‌ها باشد، چون گزارش شده است که در استخراج‌های الکلی با الکل‌هایی مانند اتانول و متانول، بسیاری از ترکیبات ضدمیکروبی مثل آلکالوئیدها، فنل‌ها، پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، ترپنوئیدها، گزانتوکسیلین‌ها، توتارول‌ها و کوازینوئیدها جدا می‌شوند، در حالی‌که با آب، آنتوسیانین‌ها، نشاسته، پروتئین، روغن، ترپنوئیدها، پلی‌پپتیدها و لکتین‌ها جدا می‌شوند (۳).

در این پژوهش عصاره آبی دانه باعث افزایش رشد معنی‌دار قارچ نسبت به شاهد شد و این اثر احتمالاً ناشی از وجود ترکیبات آلی مانند نشاسته، پروتئین و روغن در دانه و کم بودن ترکیبات فنلی و آلکالوئیدی باشد.

عصاره آبی و الکلی پوست میوه (پریکارپ) بیشترین اثر بازدارنده را روی قارچ آسپرژیلوس داشتند. هر دو عصاره با اختلاف معنی‌دار باعث کاهش تعداد کلنی‌های قارچ و کاهش قطر کلنی قارچ شدند؛ ولی اثر عصاره الکلی خیلی بیشتر بود و در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، رشد قارچ را متوقف کرد. این یافته با گزارش‌هایی که نشان داده‌اند عصاره آبی و الکلی پوست میوه اثر ضد قارچی دارد، کاملاً همخوانی دارد. عصاره آبی- الکلی (اتانول ۵۰%) پوست، دانه و آب میوه اثر ضد میکروبی روی دو باکتری و قارچ داشته است (۱۵). ترکیبات مختلف پوست میوه انار، ازجمله پلی فنل‌های روی قارچ‌های مختلف مانند فوزاریوم، آلترناریا و کاندیدا اثر بازدارنده داشته است (۲۶). اسانس پریکارپ اثر بازدارنده روی آسپرژیلوس نایجر، آلوده‌کننده میوه انار داشته است (۲۷). گزارش شوکت و همکاران (۲۰۰۷) که بیان کرده‌اند اثر بازدارنده عصاره‌های آبی و الکلی پوست میوه انار روی آسپرژیلوس نایجر و فومیگاتوس خیلی کم، ولی روی دو گونه قارچ کاندیدا شدید بوده، تا حدی متفاوت است. نتایج برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که پلی‌فنل‌ها، تانن‌ها و فلاونوئیدها فعالیت ضدمیکروبی دارند (۲۸). به تانن‌ها خواصی مثل ضدسرطان، ضدجهش، ضدمیکروبی

با بیشترین اثر روی قارچ‌ها به ویژه مخمرها، باکتری و ویروس نسبت داده‌اند (۹، ۲۹). عمل ضدقارچی تانن‌ها بر علیه باکتری‌ها و مخمرهایی مثل کاندیدا آلبیکانز ناشی از ساختار مولکولی، سمیت و خاصیت قابض آن‌ها است. تانن‌ها میل ترکیبی زیادی به پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها دارند، احتمالاً طی گذشتن از غشاء، به پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدهای آن متصل و در ساختمان و عملکرد غشای قارچ، اختلال ایجاد می‌کنند (۱۴). از طرفی، گزارش شده است که مخلوطی از ترکیبات ثانوی، وظیفه ضدمیکروبی در سطح سلولی بر ضد انواع باکتری‌ها و قارچ‌ها را برعهده دارند (۹). در این پژوهش مشخص شد که عصاره‌های آبی و الکلی همه اجزای انار دارای ترکیبات آلکالوئیدی و فنلی بوده و خاصیت ضدقارچی دارند (به جز عصاره آبی دانه). با توجه به این نتیجه، می‌توان احتمال داد که اثر ضدقارچی عصاره‌های آبی و الکلی انار رقم ملس ساوه، ناشی از وجود هر یک از ترکیبات فنلی و آلکالوئیدی، بر همکنش این مواد در کنار هم و یا ناشی از مخلوطی از ترکیبات ثانوی در کنار هم باشد. برای رسیدن به نتیجه نهایی در این زمینه، نیاز به تحقیق بیشتر برای جدا کردن ترکیبات موجود در عصاره‌های آبی و الکلی و اثر دادن تک‌تک آنها روی قارچ‌های مختلف است.

۵. نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که یکی از عوامل پوسیدگی میوه آلوده به کرم گلوگاه، احتمالاً قارچ آسپرژیلوس نایجر است. عصاره‌های آبی و الکلی اجزای میوه انار رقم ملس ساوه سرشار از ترکیبات آلکالوئیدی و فنلی هستند. عصاره همه اجزای میوه به جز عصاره آبی دانه، اثر بازدارنده روی رشد قارچ آسپرژیلوس آلوده‌کننده میوه آلوده دارند. عصاره پوست میوه بیشترین اثر بازدارنده را روی این قارچ داشته و می‌تواند رشد قارچ را متوقف کند.

References

1. Ashrafi H, Bodaghi H & Rezaei M. Morphological diversity of indigenous wild pomegranate (*Punica granatum* L. var. spinosa) accessions from northeast of Iran. *Food Science and Nutrition*. 2023; 11: 1001-1012.
2. Ahmad I, Zahin M, Aqil F, Hasan S, Khan MSA & Owais M. Bioactive compounds from *Punica granatum*, *Curcuma longa* and *Zingiber officinale* and their therapeutic potential. *Drugs in Future*. 2008; 33(4): 329.
3. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*. 1999; 12: 546-582.
4. Miguel M, Neves M & Antunes M. Pomegranate (*Punica granatum* L.): A medicinal plant with active biological properties. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010; 4(25): 2836-2847.
5. Mousavinejad G, Emam Djomeh Z, Rezaei K & Haddad Khodaparast MH. Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars. *Food Chemistry*. 2009; 115: 1274-1278.
6. Akbarnejad F. Dermatology Benefits of *Punica Granatum*: A Review of the Potential Benefits of Punica Granatum in Skin Disorders. *Asian Journal of Green Chemistry*. 2023; 7: 208-222.
7. Cutter C. Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*. 2000; 63: 601-607.
8. Mahmooda MS, Ashrafb A, Alia S, Siddiquec AB, Asadb F, Abbasd RZ, Siddiquee F, Aslamf A, Aslama R & Rafiqueb A. Portrayal of *Punica granatum* L. peel extract through High Performance Liquid Chromatography and antimicrobial activity evaluation. *Brazilian Journal of Biology*. 2023; 83: 1-7.
9. Opara LU, Al-Ani Majeed R & Al-Shuaibi Yusra S. Physico- chemical Properties, Vitamin C Content, and Antimicrobial Properties of Pomegranate Fruit (*Punica granatum* L.). *Food Bioprocess Technol*. 2009; 2: 315-321
10. Endo EH, Cortéz DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV & Filho BPD. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Research in Microbiology*. 2010; 161: 534-540.
11. Tayel AA & El-Tras WF. Anticandidal activity of pomegranate peel extract aerosol as an applicable sanitizing method. *Mycoses.* 2009; 53: 117-122.
12. Loukas T. Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. *J indian microb Biotechnol*. 2000; 25: 298–304.
13. Krijgsheld P, Bleichrodt R, Van Veluw GJ, Wang F & Muller WH. Development in *Aspergillus*. *Study in Mycology*. 2012; 74: 1-29.
14. Souza L & Correia F. Minimum Inhibitory Concentration of Adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) Gel Against, S. mutans, S. mitis and C. albicans. *Brazilian Dental Journal*. 2006; 17(3): 223-227.

15. Tavazo Zadeh E, Aref P, Askarizadeh N & Emadi F. In vitro Antimicrobial Effect of Punica granatum Extract versus Chlorhexidine on Streptococcus sobrinus, Streptococcus sanguinis, and Candida albicans. *Journal of Research of Dental of Maxillofac Science*. 2023; 8(1): 18-27.
16. Mohseni, A, Frazmand, H & Anghaei H. Pomegranate Guide. *Agriculture education Publication*. Tehran, Iran. 1999; 215-250. [in persian]
17. Khademi, O, Vazifeshenas M & Erfani-Moghadam J. Investigation of quantitative and qualitative characteristics of some commercial pomegranate cultivars in Yazd climatic conditions. *Iranian Journal of Food Science and Technology*. 2022; 127(19): 395-407. [in persian]
18. Yubin JI, Miao Yu, Wang B & Zhang Y. The extraction, separation and purification alkaloids in the natural medicine. *Journal of chemical and pharmaceutical reseach*. 2014; 6(1): 338-345.
19. Bamoniri A, Behpour M & Khayat Kashani M. Quantification of total phenolics and tannins in Pomegranate (*Punica granatum* L.) extraction for standardization to Ellagic Acid. *Journal of Optoelectronics and Biomedical Materials*. 2010; 2(1): 25-31.
20. Ajami M, Seifi E, Varasteh F & Atashi S. Evaluation of the morphological, phytochemical and antioxidant capacity of (*Punica granatum* L.) Toosefid cultivar from Gorgan in comparison with two commercial cultivars. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*. 2023; 10(4): 14-26.
21. Malekshahi G & ValizadehKaji B. Effects of Postharvest Edible Coatings to Maintain Qualitative Properties and to Extend Shelf-life of Pomegranate. *International Journal of Horticultural Science and Technology*. 2021; 8(1): 67-80.
22. Zargari A. Medicinal plants (2). *University of Tehran Publication*. Tehran, Iran. 1996; 465-467. [in persian]
23. Julie Jurenka MT. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): (A review). *Alternative Medcinal Review*. 2008; 13: 123-144.
24. Ramakrishnan K, Selvi SR & Shubha R. Tannin and its Analytical Techniques. *Indian Chemical Engr*. 2006; 48(2): 88-94
25. Johann S, Cisalpino PS, Watanabe GA, Cota BB, Siqueira EP, Pizzolatti MG, Zani CL & Resende MA. Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus Paracoccidioides brasiliensis. *Pharmacology and Biology*. 2010; 48: 388-396.
26. Glazer I, Masaphy S, Barilan I, Holland D, Kerem Z & Amir R. Partial identification of antifungal compounds from *Punica granatum* peel extracts. *Journal of agriculture and food chemistry*. 2012; 60(19): 4841-4848.
27. Jahani M, Pira M & Aminifard MH. Antifungal effects of essential oils against *Aspergillus niger* in vitro and in vivo on pomegranatae (*Punica granatum*) fruits. *Scientica Horticulturae.* 2020; 264: 109-118.
28. Shaokat SS, Hameed HA & Mohammad HJ. Anti-fungal activity of *Punica granatum*. peels powder and extracts from pathogenic samples. *Iraqi Journal of Pharmacy Science*. 2007;

16(2): 12-19.

29. Haidari M, Ali M, Casscells SW & Madjid M. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*. 2009; 16: 1127-1136.