کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۴، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴ (۶۴-۵۷)

تأثیر نانوامولسیون اسانس دارچین در کاهش پوسیدگی‌های پس از برداشت میوهٔ توت‌فرنگی

۱. حمیدرضا علیزاده*؛ ۲. محسن فرزانه؛ ۳. ذبیح‌الله اعظمی
۱ و ۳. استادیاران گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه جیرفت
۲. استادیار گروه کشاورزی، پژوهشکدهٔ گیاهان و مواد اولیهٔ دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین ـ تهران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۲۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۷/۲۱)

چکیده

کاربرد اسانس‌ها در کنترل بیمارگرهای گیاهی عموماً به‌دلیل محلولیت پایین در آب، فشار بخار بالا و ناپایداری فیزیکی و شیمیایی با دشواری‌هایی همراه است. یکی از روش‌های به‌حداقل‌رساندن این تأثیرات، استفاده از سیستم نانوامولسیون است. افزون بر این ضمن سهولت کاربرد و پایداری باعث افزایش خواص ضد میکروبی نیز می‌شود. در این تحقیق، پس از تهیهٔ اسانس دارچین (*Cinammon zeylanicum*)، نانوامولسیون اسانس تهیه و مشخصات فیزیکی و شیمیایی آن مشخص شد. اندازهٔ ذره‌ای نانوامولسیون ۳/۹۷±۱۱۵/۳۳ نانومتر تعیین شد. امولسیون و نانوامولسیون اسانس به‌همراه قارچ‌کش تیابندازول در غلظت‌های مختلف مادهٔ مؤثره برای کنترل قارچ‌های *Rhizopus stolonifer* و *Botrytis cinerea* عامل پوسیدگی میوهٔ توت‌فرنگی مطالعه شدند. نتایج در محیط کشت جامد PDA نشان داد که امولسیون و نانوامولسیون اسانس دارچین تفاوت معنی‌داری در فعالیت ضد قارچی نداشت و علیه قارچ‌های *B. cinerea* و *R. stolonifer* به‌ترتیب حداقل غلظت بازدارندگی کامل برابر ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر مادهٔ مؤثره در لیتر محیط کشت نشان دادند. نتایج روی میوه نشان داد که نانوامولسیون اسانس نسبت به امولسیون اسانس، تأثیر بیشتری در کاهش پوسیدگی‌های قارچی میوهٔ توت‌فرنگی دارد. در بالاترین غلظت کاربردی (۲ در هزار)، بین تیابندازول با نانوامولسیون اسانس دارچین تفاوت معنی‌دار در کاهش پوسیدگی رایزوپوسی میوه مشاهده نشد. در کنترل پوسیدگی خاکستری میوه ناشی از *B. cinerea*، نانوامولسیون دارچین در غلظت‌های ۲ در هزار و ۱ در هزار به‌ترتیب با ۳/۳۳ و ۵/۸۳ درصد پوسیدگی خاکستری میوه، بیشترین تأثیر را در کاهش پوسیدگی داشت. نانوامولسیون اسانس دارچین برای ساخت قارچ‌کش‌های طبیعی می‌تواند توصیه شود.

کلیدواژگان: اسانس دارچین، توت‌فرنگی، کنترل پوسیدگی قارچی، نانوامولسیون.

مقدمه

گیاه توت‌فرنگی به خانوادهٔ Rosaceae و جنس *Fragaria* تعلق دارد که حساسیت آن به پوسیدگی‌های قارچی به‌خصوص *Rhizopus stolonifer* و کپک خاکستری حاصل از *Botrytis cinerea*، باعث شده است که یکی از میوه‌های بسیار فسادپذیر باشد و طول عمر پایینی داشته باشد. بنابراین، کاربرد سموم شیمیایی برای کاهش خسارت ناشی از عوامل بیماریزای گیاهی پس از برداشت اجتناب‌ناپذیر است (Behnamian and Masiha 2002). استفاده از قارچ‌کش‌ها بهترین راه کنترل بیماری‌های پس از برداشت

* تلفن: ۰۹۱۲۵۶۶۵۹۷۲
E-mail: hamidalizadeh@ujiroft.ac.ir

است. سم‌پاشی میوه‌ها پیش از برداشت با بنومیل[1] و بلافاصله پس از برداشت با تیابندازول[2]، شستن میوه‌ها با سدیم اورتوفنیل فنات[3] یا ایمازالیل[4] به‌صورت محلول یا تیمارهای واکسی در خطوط بسته‌بندی و جعبه‌زنی کارخانه‌ها رایج‌ترین روش کنترل بیماری‌های پس از برداشت هستند (Narayanasamy 2006). کاربرد این سموم شیمیایی، زیان‌هایی چون مسمومیت حاد یا مزمن برای موجودات غیرهدف از جمله انسان در پی دارد که با خاصیت تجمعی در بدن موجودات زنده یا خاصیت سرطان‌زایی همراه است. از طرف دیگر افزایش مقاومت به قارچ‌کش مورد استفاده در جمعیت بیمارگرهای پس از برداشت نیز یک مشکل جدی است (Barkai-Golan 2001, Ill and Kruger 1999).

امروزه، به‌دلیل توجه ویژه به سلامتی انسان و محیط زیست، انگیزه‌ها برای یافتن روش‌های جایگزین سموم بسیار بیشتر شده است. بنابراین، تقویت هرچه بیشتر روش‌های طبیعی و استفاده از فرآورده‌های گیاهی که خاصیت ضد قارچی دارند نیز بسیار مورد توجه است (Gyawali and Ibrahim 2014). اسانس‌ها به‌دلیل تأثیرگذاری در فاز بخار، امکان کنترل بیماری‌های پس از برداشت محصولات کشاورزی و غذایی را به صورت تدخینی نیز فراهم می‌کنند (Paster *et al.* 1995, Hammer *et al.* 1999, Tripathi *et al.* 2008).

مصرف اسانس‌ها عموماً به‌دلیل محلولیت پایین در آب، فشار بخار بالا و ناپایداری فیزیکی و شیمیایی با دشواری‌هایی در کاربرد همراه است (Ardalan 2014). علاوه بر این، اسانس‌ها در محصولات ایجاد بو و مزه می‌کنند که این امر خوشایند مصرف‌کنندگان نیست؛ بنابراین، امروزه تلاش می‌شود تا تأثیرات نامطلوب اسانس‌ها کاسته شود. یکی از روش‌های به‌حداقل‌رساندن این تأثیرات نامطلوب، استفاده از نانوامولسیون آن‌هاست که سبب افزایش پایداری ترکیبات فرار، محافظت آن‌ها در برابر تأثیرات متقابل با سایر ترکیبات و افزایش خواص ضد میکروبی از طریق افزایش جذب سلولی می‌شود (Donsi *et al.* 2011).

در این تحقیق سعی شده است که برای به حداقل رساندن ضایعات میوهٔ توت‌فرنگی بین محل تولید تا مصرف و کاهش باقیماندهٔ سموم شیمیایی، تأثیر امولسیون و نانوامولسیون اسانس گیاه دارویی و ادویه‌ای دارچین بر کنترل پوسیدگی رایزوپوسی و کپک‌خاکستری میوهٔ توت‌فرنگی بررسی شود تا در صورت حصول نتایج مطلوب، بتوان از آن به‌عنوان جایگزین قارچ‌کش‌های شیمیایی در کاهش ضایعات پس از برداشت میوهٔ توت‌فرنگی بهره برد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ مواد گیاهی و استخراج اسانس

پوست خشک‌شدهٔ درخت دارچین از عطاری تهیه و با آسیاب خرد شد. سپس، اسانس آن به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر[5] به‌مدت سه ساعت استخراج شد. استخراج اسانس برای هر نمونه در سه تکرار و برای هر تکرار ۵۰ گرم نمونهٔ گیاهی استفاده شد. اسانس به‌دست‌آمده به کمک سولفات سدیم خشک آبگیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس درون یخچال تا زمان آنالیز و بررسی آزمون ضد قارچی نگه‌داری شد.

تهیهٔ فرمولاسیون نانوامولسیون اسانس

فرمولاسیون نانوامولسیون اسانس دارچین (حاوی ۱۰ درصد اسانس)، از گروه مهندسی شیمی پژوهشکدهٔ گیاهان و مواد اولیهٔ دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شد (Ardalan 2014). برای تهیهٔ نانو ذرات اسانس از دستگاه پروب شرکت امواج فراصوت، با ژنراتور مدل MTI سوئیس، ۴۰۰ وات، ۲۲۰ ولت، فرکانس ۲۰/۵ کیلوهرتز، دامنهٔ ۳۰ درصد و قطر پروب ۱۹ سانتی‌متر استفاده شده بود. برای تهیهٔ نانوامولسیون از اسپن۸۰[6]، توین ۸۰[7] و ولسیتین[8] استفاده شده بود. در انتها، ظروف حاوی نانوامولسیون به‌خوبی پوشانده و در دمای یخچال و دور از نور نگه‌داری شدند.

1. Benlate
2. TBZ
3. SOPP
4. Lmazalil
5. Clevenger
6. Span 80
7. Tween 80
8. Lecithin

تعیین اندازهٔ ذره‌ای نانوامولسیون‌ها

اندازهٔ ذره‌ای نانوامولسیون تهیه‌شده به کمک دستگاه DLS[1] تعیین شد. همچنین، محدودهٔ توزیع ذرات به کمک دستگاه به‌دست آمد (Ghaderi 2014).

تهیهٔ زادمایهٔ بیمارگر

دو قارچ عامل پوسیدگی پس از برداشت میوهٔ توت‌فرنگی *B. cinerea* SBU205 و *R. stolonifer* SBU204 از کلکسیون میکروبی پژوهشکدهٔ گیاهان و مواد اولیهٔ دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهیه شدند. برای تهیهٔ زادمایهٔ جدایهٔ مورد نظر، از کشت یک هفته‌ای آن روی محیط PDA نگه‌داری‌شده در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس و دورهٔ نوری معمولی (دوازده ساعت روشنایی، دوازده ساعت تاریکی) استفاده شد. سوسپانسیون اسپور در آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۸۰ تهیه و سپس، به کمک هماسیتومتر به‌غلظت 10^4 اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون تعیین شد.

بررسی اثر ضد قارچی امولسیون و نانوامولسیون اسانس در آزمایشگاه

اثر ضد قارچی امولسیون و نانوامولسیون اسانس دارچین روی قارچ‌های عامل کپک‌خاکستری و پوسیدگی نرم توت‌فرنگی به روش اختلاط اسانس با محیط کشت PDA بررسی شد. به این منظور از اسانس مورد نظر در محلول توین ۸۰ (۰/۵ درصد)، امولسیون ۱۰ درصد تهیه شد. همچنین، محلول توین۸۰ (۰/۰۵ درصد) به‌عنوان تیمار شاهد درنظر گرفته شد. فلاسک‌های حاوی محیط کشت PDA پس از اتوکلاو، در دمای اتاق قرار داده شدند تا دمای آن‌ها به ۴۵ـ۴۲ درجهٔ سلسیوس تنزل یابد. غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد از امولسیون و نانوامولسیون اسانس که به‌ترتیب معادل ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر اسانس در لیتر است، به‌طور جداگانه در فلاسک‌های حاوی محیط PDA تهیه و به‌هم زده شدند تا یکنواخت شوند. محیط‌های حاصل بلافاصله درون ظروف پتری به قطر ۹ سانتی‌متری تقسیم و اجازه داده شدند تا محیط جامد شود. سپس، دیسک‌های قارچی به قطر ۵ میلی‌متر توسط چوب‌پنبه سوراخ‌کن از کشت‌های جوان قارچ‌های مذکور تهیه شدند و یک دیسک قارچ در قسمت وسط ظروف پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. پتری‌های مایه‌زنی در انکوباتور در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. پس از گذشت بیست و چهار ساعت، رشد رویشی هالهٔ قارچ تا زمانی اندازه‌گیری شد که سطح محیط کشت پتری‌های شاهد توسط قارچ به‌طور کامل اشغال شد. در انجام این آزمایش برای هر تیمار سه تکرار درنظر گرفته شد.

بررسی خاصیت ضد قارچی روی میوهٔ توت‌فرنگی

میوه‌های توت‌فرنگی (یکسان از نظر اندازه و شاخص رسیدگی) رقم سلوا[2]، بدون هرگونه عارضهٔ فیزیکی و شیمیایی از گلخانه‌ای واقع در شهر جدید هشتگرد، استان البرز، تهیه شدند. برای ضدعفونی سطحی، میوه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور و سپس، دوبار با آب مقطر سترون شست‌وشو شدند. پس از خشک‌شدن، در شرایط سترون طی دو آزمایش جداگانه در سوسپانسیون اسپور قارچ *R. stolonfier* و سوسپانسیون اسپور *B. cinerea* (به‌غلظت 10^4 اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون) به‌مدت یک دقیقه فرو برده شدند. سپس، غلظت های ۰/۵، ۱ و ۲ درصد از امولسیون و نانوامولسیون اسانس (معادل ۰/۵، ۱ و ۲ در هزار ماده موثره اسانس) در آب مقطر سترون تهیه و میوه‌های مایه‌زنی‌شده، به روش محلول‌پاشی تیمار شدند.

قارچ‌کش تیابندازول[3] (تکتو ۶۰) در آب مقطر سترون (در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ در هزار ماده موثره) به‌عنوان شاهد به‌کار برده شد. دیگر تیمارهای شاهد شامل شاهد آلوده (میوه‌های سالم مایه‌زنی‌شده با اسپور بیمارگر+محلول‌پاشی با آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۸۰) و شاهد سالم (میوه‌های سالم+محلول‌پاشی با آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۸۰) بودند (Lee *et al.* 2007). هر پنج عدد میوه به‌عنوان یک تکرار در ظرف پلاستیکی شفاف به ابعاد ۱۴×۱۱×۱۴ سانتی‌متر قرار داده شد (Reddy *et al.* 1997). آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. درصد پوسیدگی ریزوپوسی در میوه‌های

1. Dynamic Light Scattering

2. Selva
3. Thiabendazole (Tecto 60®)

توت‌فرنگی پس از پنج روز نگه‌داری و درصد پوسیدگی‌خاکستری پس از ده روز نگه‌داری در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس اندازه‌گیری شد. آلودگی هر میوه براساس میزان لهیدگی و پوسیدگی سطح میوه بود؛ بدین‌صورت که هر میوه به هشت قسمت تقسیم شد، علایم بیماری در هر قسمت برابر با ۱۲/۵ درصد برآورد شد (Huang *et al.* 2011). به‌عبارتی شدت بیماری میوه‌های توت‌فرنگی آلوده‌شده بین ۰ تا ۸ ارزیابی شد. عدد صفر نشان‌دهندهٔ میوهٔ سالم و اعداد ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ پوسیدگی کمتر از ۱۲/۵ درصد، بین ۱۲/۵ تا ۲۵ درصد، بین ۲۵ تا ۳۷/۵ درصد، بین ۳۷/۵ تا ۵۰ درصد، بین ۵۰ تا ۶۲/۵ درصد، بین ۶۲/۵ تا ۷۵ درصد، بین ۷۵ تا ۸۷/۵ درصد و بیش از ۸۷/۵ درصد است. در تمامی تیمارها میزان آلودگی میوه ثبت شد و میزان کنترل در تیمارهای مختلف با استفاده از نسبت میزان آلودگی در تیمار به میزان آلودگی در شاهد آلوده و کاستن آن از عدد ۱ محاسبه شد.

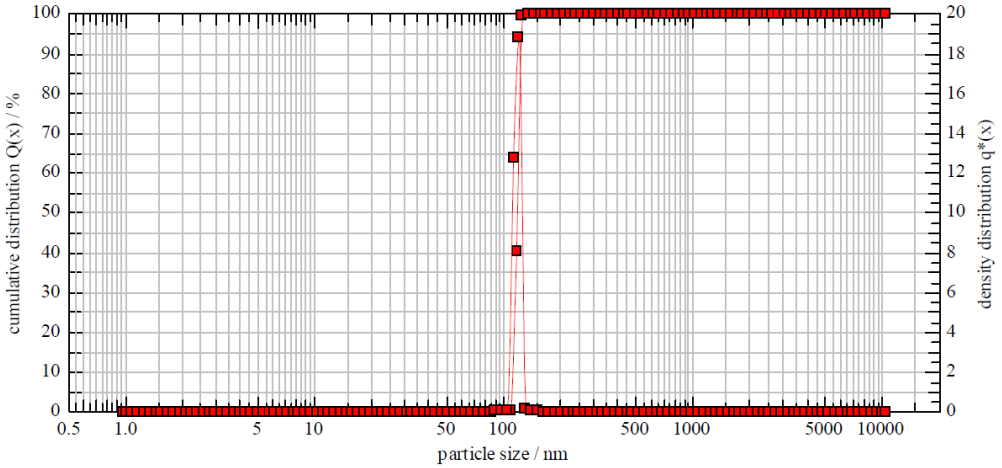
تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیهٔ داده‌ها از دو نرم‌افزار به تفکیک کارهای مورد نیاز استفاده شد. در ابتدا، نرمال‌بودن داده‌ها به کمک نرم‌افزار Mini-tab مشخص شد. برای تجزیهٔ واریانس از نرم‌افزار SAS و به روش GLM استفاده شد. پس از تجزیهٔ واریانس، میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۱ و ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

بررسی پراکنش اندازهٔ ذرات نانوامولسیون تهیه‌شده

طبق شکل ۱، میانگین اندازهٔ ذرات نانوامولسیون دارچین برابر با ۳/۹۷±۱۱۵/۳۳ نانومتر است. محدودهٔ توزیع اندازهٔ ذره‌ای نیز در نانوامولسیون دارچین ۳/۹۰±۱۵/۵۶ است. هرچه محدودهٔ توزیع اندازهٔ ذره‌ای حاصل بیشتر باشد، نانوامولسیون ناپایدارتر است، نانوامولسیون‌ها به‌طور معمول با دو مکانیسم مجزای برگشت‌ناپذیر ناپایدار می‌شوند.



شکل ۱. میانگین اندازهٔ ذره‌ای و توزیع اندازهٔ ذره‌ای نانوامولسیون (برحسب نانومتر) به‌دست‌آمده از دستگاه DLS

بررسی اثر ضد قارچی امولسیون و نانوامولسیون اسانس در آزمایشگاه

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی اثر ضد قارچی امولسیون و نانوامولسیون اسانس دارچین بر رشد قارچ‌ها نشان داد که به‌طور کلی با افزایش غلظت اسانس، میزان فعالیت ضد قارچی افزایش یافت. میزان شدت افزایش خاصیت بازدارندگی روی قارچ *B. cinerea* مشهودتر بود (جدول ۱).

با توجه به نتایج، امولسیون و نانوامولسیون اسانس دارچین با حداقل غلظت بازدارندگی کامل برابر ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر محیط کشت، فعالیت ضد قارچی علیه قارچ *B. cinerea* نشان داد؛ در حالی‌که، علیه قارچ *R. stolonifer* در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر محیط کشت، بازدارندگی کامل نشان داد (جدول ۱).

نتایج به‌دست‌آمده از واکشت دیسک‌های قارچی در تیمارهایی که رشد قارچی در آن‌ها مشاهده نشد

به‌منظور بررسی قارچ‌کش یا قارچ‌ایستابودن غلظت اسانس، نشان داد امولسیون و نانوامولسیون اسانس دارچین در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر مادهٔ مؤثره در لیتر محیط کشت، فعالیت قارچ‌کشی علیه هر دو قارچ دارد.

جدول ۱. بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف امولسیون و نانوامولسیون اسانس دارچین در بازدارندگی از رشد قارچ‌های *Rhizopus stolonifer* و *Botrytis cinerea* در محیط کشت PDA

تیمار	مادهٔ مؤثره (میکرولیتر در لیتر)	درصد بازدارندگی	
		Rhizopus stolonifer	*Botrytis cinerea*
امولسیون اسانس	۱۲۵	۳/۰۷±۰/۳۲	۴۳/۲۲±۰/۲۵
	۲۵۰	۲۸/۴۳±۰/۹۱	۶۴/۸۷±۰/۸۳
	۵۰۰	۶۴/۸±۰/۹۸	۱۰۰[nd]
	۱۰۰۰	۱۰۰[nd]	۱۰۰[nd]
نانوامولسیون اسانس	۱۲۵	۹/۲۱±۰/۱۸	۴۸/۰۲±۰/۴۶
	۲۵۰	۴۴/۷۴±۰/۷۵	۶۹/۱۲±۰/۸۲
	۵۰۰	۷۰/۳۳±۱/۰۲	۱۰۰[nd]
	۱۰۰۰	۱۰۰[nd]	۱۰۰[nd]

nd نشان‌دهندهٔ نبودن پرگنهٔ قارچی قابل اندازه‌گیری است. هر عدد میانگین سه تکرار است.

بررسی کارایی امولسیون و نانوامولسیون اسانس در کاهش پوسیدگی‌خاکستری میوهٔ توت‌فرنگی

میزان پوسیدگی‌خاکستری میوه در شاهد آلوده برابر با ۹۸/۳۳ درصد محاسبه شد. طبق نتایج حاصل از جدول ۲، از نظر میزان پوسیدگی‌خاکستری میوه، بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. به‌طور کلی با افزایش غلظت امولسیون و نانوامولسیون اسانس فعالیت ضد قارچی افزایش یافت. امولسیون اسانس در غلظت ۲ در هزار و نانواسانس در غلظت‌های ۱ و ۲ در هزار بیشترین میزان بازدارندگی از پوسیدگی‌خاکستری میوه را نشان دادند و با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند، اما با سم تیابندازول تفاوت معنی‌دار داشتند. نانواسانس دارچین در غلظت ۲ در هزار با شاهد سالم که میزان آلودگی میوه در آن صفر درصد بود، تفاوت معنی‌دار نشان نداد. قارچ‌کش تیابندازول در بالاترین غلظت (۲ در هزار) با ۱۰/۸۳ درصد آلودگی میوه، تأثیر کمتری نسبت به نانوامولسیون نشان داد.

جدول ۲. مقایسهٔ میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس دارچین بر کاهش میزان پوسیدگی میوهٔ توت‌فرنگی ناشی از *Botrytis cinerea* پس از ده روز نگه‌داری در تاریکی و دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس

تیمار	میزان آلودگی میوه (٪)					
مادهٔ مؤثره:	۰/۵ در هزار		۱ در هزار		۲ در هزار	
امولسیون اسانس	۴۱/۷±۱/۶۹	b	۱۰/۸۳±۱/۶۹	e	۵/۸۳±۱/۶۹	fg
نانوامولسیون اسانس	۱۲/۵۰±۱/۴۷	d	۵/۸۳±۱/۴۷	fg	۳/۳۳±۰/۸۵	g
توبین ۸۰ (۰/۰۵ درصد)	۹۸/۳۳±۰/۸۵	a	۹۶/۶۶±۰/۸۵	a	۹۷/۵۰±۰/۸۵	a
تیابندازول	۲۲/۵۰±۲/۵۴	c	۱۳/۳۳±۰/۸۵	e	۱۰/۸۳±۱/۶۹	e

* هر عدد میانگین سه تکرار است

** حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪≥p است.

بررسی کارایی امولسیون و نانوامولسیون اسانس در کاهش پوسیدگی‌رایزوپوسی میوهٔ توت‌فرنگی

امولسیون و نانوامولسیون اسانس اثر معنی‌داری بر میزان آلودگی ناشی از قارچ *R. stolonifer* در سطح احتمال ۱ درصد داشتند (جدول ۳). نتایج حاصل از بررسی اسانس‌ها در کاهش پوسیدگی ناشی از *R. stolonifer* در روز پنجم پس از انبارداری نشان داد، به‌طور کلی با افزایش غلظت اسانس، فعالیت ضد قارچی افزایش یافت

و اسانس در غلظت ۲ در هزار بیشترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ را نشان داد که با سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌دار داشت. در نانو اسانس‌ها نیز با افزایش غلظت، فعالیت ضد قارچی افزایش یافت، به‌طوری که نانوامولسیون دارچین در غلظت ۲ در هزار با ۱۲/۵ درصد آلودگی، بیشترین میزان کنترل را نشان داد.

جدول ۳. مقایسهٔ میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف امولسیون و نانوامولسیون اسانس دارچین بر کاهش میزان پوسیدگی‌نرم میوهٔ توت‌فرنگی ناشی از *Rhizopus stolonifer* پس از پنج روز نگه‌داری در تاریکی و دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس

تیمار	مادهٔ مؤثره	میزان آلودگی میوه (٪)					
		۰/۵ در هزار		۱ در هزار		۲ در هزار	
امولسیون اسانس		۹۱/۶۶±۰/۸۵	a	۶۳/۳۳±۲/۲۴	d	۳۱/۶۶±۱/۶۹	e
نانوامولسیون اسانس		۹۱/۶۶±۲/۲۴	a	۶۵/۰۰±۱/۴۷	d	۱۲/۵۰±۱/۴۷	g
توین ۸۰ (۰/۰۵ درصد)		۹۱/۶۶±۲/۲۴	a	۹۱/۶۶±۲/۲۴	a	۹۱/۶۶±۲/۲۴	a
تیابندازول		۸۷/۵۰±۱/۴۷	b	۶۹/۱۶±۰/۸۵	c	۱۹/۱۶±۳/۰۶	f

حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $p\leq$٪۵ است.

* میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD بدون اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

تولید و مصرف گیاهان دارویی در صنایع دارویی و غذایی به‌علت داشتن ترکیبات فعال بیولوژیک رو به گسترش است. علاوه بر این تحقیقات گسترده‌ای آغاز شده است که نشان می‌دهند، متابولیت‌های ثانویهٔ برخی گیاهان دارویی در جلوگیری از رشد قارچ‌های بیمارگر گیاهی مؤثر و جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی هستند (Archer 2002). تاکنون، تأثیر اسانس‌های برخی گیاهان دارویی از قبیل مرزه، آویشن، دارچین، مرزنجوش، ریحان و غیره در کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه‌جات در انبار گزارش شده است (Ziedan and Farrag 2008, Tripathi *et al*. 2008, Defera *et al*. 2002, Bouchra *et al*. 2003, Chebli *et al*. 2004 Ozan, 2003, Vagelas *et al*. 2009, Tajkarimi *et al*. 2010, Charles *et al*. 2012). در ایران کاربرد اسانس‌هایی از قبیل ریحان، رازیانه، زیرهٔ سبز، مرزه، نعنافلفلی و آویشن در کنترل *B. cinerea* و *R. stolonifer* مؤثر شناخته شده است (Asghari-Marjanlo *et al*. 2008, Behnam *et al*. 2006 Farzaneh *et al*. 2007, Ranjbar *et al*. 2008). مشابه آن کاربرد اسانس‌های گیاهی از قبیل مرزنجوش و دارچین در آب شست‌وشوی سبزیجات، موفقیت زیادی در کنترل کپک‌ها و بیمارگرهای سبزیجات داشته است (Burt 2004, Goni *et al*. 2009). در این تحقیق نیز اسانس دارچین، فعالیت ضد قارچی چشمگیری در کنترل پوسیدگی‌های خاکستری و رایزوپوسی میوهٔ توت‌فرنگی نشان داد. اثر اسانس در جلوگیری از رشد قارچ مربوط به وجود مواد مؤثرهٔ آن‌هاست. نتایج آنالیز اسانس نشان داده است که ترکیب غالب اسانس دارچین مادهٔ سیناماآلدهید است که خاصیت ضد قارچی و ضد میکروبی آن ثابت شده است (Bendahou *et al*. 2008, Tajkarimi *et al*. 2010). متأسفانه، مصرف اسانس‌ها عموماً به‌دلیل محلولیت پایین در آب، فشار بخار بالا و ناپایداری فیزیکی و شیمیایی با دشواری‌هایی در کاربرد همراه است. همچنین، اسانس‌ها تأثیرات ارگانولپتیک نیز دارند و در محصولات ایجاد بو و مزه می‌کنند (Hyldgaard *et al*. 2012). یکی از روش‌های به حداقل رساندن این تأثیرات، استفاده از نانوامولسیون آن‌هاست که با توجه به کوچک‌تربودن اندازهٔ ذرات در افزایش پایداری و نیمهٔ عمر مادهٔ مؤثره و سهولت رسیدن به موضع اثر نقش مهمی دارد. افزون بر این ضمن سهولت کاربرد (امولسیون‌شدن آسان و سریع)، باعث افزایش خواص ضد میکروبی از طریق افزایش جذب سلولی می‌شود (Donsi *et al*. 2011). از طرفی اندازهٔ ذره‌ای نانوامولسیون معیاری برای میزان پایداری آن است، هرچه اندازهٔ ذره‌ای بزرگ‌تر و محدودهٔ توزیع اندازهٔ ذره‌ای حاصل بیشتر باشد، نانوامولسیون ناپایدارتر است؛ چون ذرات بزرگ‌تر به هم پیوسته‌اند و تجمع پیدا می‌کنند و باعث ناپایداری نانوامولسیون می‌شوند (Wilkinson 1994). در این تحقیق توزیع اندازهٔ ذرات

نانوامولسیون اسانس حدود ۱۱۵ نانومتر بود که نشان از پایداری آن است. نانوامولسیون اسانس‌ها از نظر خصوصیات ساختاری و فیزیکی با امولسیون آن‌ها تفاوت دارند. استفاده از کمک حلال‌ها در تهیهٔ نانو ذرات اسانس‌ها، به تولید فرمولاسیونی با ویسکوزیته و پایداری مناسب منجر می‌شود (Mandal and Bera 2012). علاوه بر این، کوچک‌بودن اندازهٔ ذرات نیز برای افزایش پایداری و نیمهٔ عمر مادهٔ مؤثره و سهولت رسیدن به موضع اثر بسیار مورد توجه است (Mason *et al*. 2006).

در این تحقیق، نانوامولسیون اسانس دارچین در مقایسه با اسانس، فعالیت ضد قارچی بیشتری در کنترل پوسیدگی‌خاکستری و پوسیدگی نرم میوهٔ توت‌فرنگی نشان داد. مشابه نتایج ما، کارایی مؤثر نانوامولسیون اسانس‌های دارچین، مرزهٔ خوزستانی و آویشن دنایی در کنترل باکتری‌های بیمارگر انسانی به اثبات رسیده است (Ardalan 2014, Ghaderi 2014, Pourhossein-Alamdary 2012). همچنین، کاربرد نانوامولسیون‌های اسانس آویشن دنایی و مرزهٔ خوزستانی در کنترل پوسیدگی‌نرم رایزوپوسی توت‌فرنگی مؤثر شناخته شده است (Seifi *et al*. 2014).

نانوامولسیون‌ها به‌عنوان سیستم‌های انتقال مواد چربی‌دوست در صنایع داروسازی، به‌عنوان طعم‌دهنده و مواد آنتی‌باکتریال در صنایع غذایی، حل‌کردن آفت‌کش‌های نامحلول در آب در صنایع کشاورزی و به‌عنوان حامل‌های مراقبت از پوست و محصولات شخصی در صنایع آرایشی ـ بهداشتی به‌کار می‌روند (Ghosh *et al*. 2013). این ذرات با دیوارهٔ سلولی بیمارگر آمیخته می‌شوند و تخریب آن‌ها را آغاز می‌کنند. این مکانیسم غیرتخصصی سبب ایجاد مقاومت در سویه‌ها نیز نمی‌شود. از طرفی دربارهٔ کاربردی‌شدن اسانس‌ها به‌عنوان قارچ‌کش‌های گیاهی، تهیهٔ سیستم همگن آبی پایدار حاوی اسانس به‌منظور تسهیل استفادهٔ تجاری آن ضروری است و سهولت کاربرد به‌واسطهٔ رقیق‌کردن سریع امولسیون در آب توسط کشاورز و دیگر مصرف‌کنندگان امکان‌پذیر می‌شود (Seifi *et al*. 2014).

در پایان، براساس نتایج این پژوهش، نانوامولسیون دارچین برای کنترل قارچ‌های انباری میوهٔ توت‌فرنگی در شرایط پس از برداشت پیشنهاد می‌شود. پس از تکمیل مطالعهٔ تأثیرات آن روی خصوصیات کیفی میوه و حصول نتایج مطلوب، پیشنهاد می‌شود به‌عنوان جایگزین قارچ‌کش‌های شیمیایی پرمصرف در کاهش ضایعات پس از برداشت میوهٔ توت‌فرنگی، به‌صورت تجاری تولید و استفاده شود.

سپاسگزاری

بودجه و امکانات این تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه جیرفت، طرح شمارهٔ ۴ـ۹۲ـ۲۸۲۰، تأمین شده است. از همهٔ عزیزانی که برای اجرای این تحقیق ما را یاری کردند، کمال تشکر را داریم.

REFERENCES

Ardalan F (2014) Formulation of nanoemulsions from essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* in treatment of *Helicobacter pylori* infection. Master of Science thesis, Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University. Pp.72. (in Persian)

Asghari Marjanlo A, Mostofi Y, Shoeibi Sh, Fattahi M (2008) Effect of basil essence on controlling gray rot and postharvest quality of strawberries. Journal of Medicinal Plants, 8(1): 131-139.

Barkai-Golan R (2001) Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables, Development and Control. Elsevier Science B.V. Amsterdam 22: 39-46.

Behnam S, Farzaneh M, Ahmadzadeh M, Tehrani AS (2006) Composition and antifungal activity of essential oils of *Mentha piperita* and *Lavendula angustifolia* on post-harvest phytopathogenes. Communications in agricultural and applied biological sciences, 71: 1321-1326.

Behnamian M, Masiha S (2002) Strawberry. Sotodeh Publishing. Tabriz, Iran. Pp.120. (in Persian)

Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, Benyoucef M, Desjobert JM, Bernardini AF (2008) Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydro distillation. Food Chemistry 106: 132-139.

Bouchra C, Achouri M, Idrissi-Hassani LM, Hmamochi M (2003) Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Morcoccan Labiatea against *Botrytis cinerea* Pers : Fr. Journal of Ethnopharmacology 89: 165-169.

Burt S (2004) Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. International Journal of Food Microbiology 94(3): 223-253.

Charles A, Onyeani SO, Osunlaja OO, Oworu AO (2012) Evaluation of effect of aqueous plant extract in the control of storage fungi. International Journal of Science and Technology 1(6): 72-82.

Chebli B, Hmamouchi M, Achouri M, Idrissi–Hassani LM (2004) Composition and in vitro fungitoxic activity of 19 essential oils against two post-harvest pathogens. Journal of Essential Oils Research 16: 507-511.

Defera DJ, Zigas BN, Polission MG (2002) The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea, Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. Crop Protection 22: 39-44.

Donsi F, Annuanziata M, Sessa M, Ferrari G (2011) Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. Food Science and Technology 44: 1908-1914.

Farzaneh M, Ranjbar H, Hadian J, Mirjalili MH (2007) Biological control of some postharvest diseases of strawberry fruit by essential oils. 59th international symposium on crop protection, Ghent University 273.

Ghaderi L (2014) Formulation of nanoemulsions from essential oil of *Thymus daenensis* in treatment of sinusitis. Master of Science thesis, Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University. Pp.96. (in Persian)

Ghosh V, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2013) Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. Ultrasonics Sonochemistry 20(1): 338-344.

Goni P, Lopez P, Sanchez C, Gomez-Lus R, Becerril R, Nerin C (2009) Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. Food Chemistry 116: 982-89.

Gyawali R, Ibrahim SA (2014) Natural products as antimicrobial agents. Food Control 46: 412-429

Hammer KA, Carson CF, Riely TV (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology 86: 985-990.

Huang R, Li GQ, Zhang J, Yang L, Che HJ, Jiang DH, Huang HC (2011) Control of postharvest Botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. Phtopathology 101(7): 859-869.

Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Frontiers in Microbiology 3: 1-12.

Lee SO, Choi GJ, Jang KS, Lim HK, Cho KY, Kim JC (2007) Antifungal activity of five plants essential oils as fumigant against postharvest and soil borne plant pathogenic fungi. Plant Pathology Journal 23(2): 97-102.

Mandal A, Bera A (2012) Surfactant stabilized nanoemulsion: Characterization and application in enhanced oil recovery. World Academy of Science, Engineering and Technology 67: 21-26.

Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves S (2006) Nanoemulsions: formation, structure and physical properties. Journal of Physics: condensed matter 18: 35-66.

Narayanasamy P (2006) Postharvest pathogens and disease management. John Wiley and Sons Inc. Hoboken, New Jersey.

Ozan M (2003) Antifungal effects of some Turkish spice essential oils on *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea* growth. Agrimedia GmbH 8: 173-175.

Paster N, Menasherov M, Ravid U, Juven B (1995) Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. Journal of Food Protection 58: 81-85.

Pourhossein-Alamdary M (2012) Design formulation of *Satureja khuzistanica* essential oil nanoemulsions in treatment of sinusitis. Master of Science thesis, Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University. Pp.116. (in Persian)

Ranjbar H, Farzaneh M, Hadian J, Mirjalili MH, Sharifi R (2008) Antifungal activity of the some essential oils on postharvest diseases of strawberry fruit. Pajouhesh and Sazandegi 81: 54-60. (in Persian)

Reddy MVB, Angers P, Gosselin A, Arul J (1997) Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. Phytochemistry 47: 1515-1520.

Seifi F, Farzaneh M, Rafati H, Rezadoost H (2014) Antifungal potency of some medicinal plants essential oils nanoemulsions to control soft rot in strawberry fruit caused by *Rhizopus stolonifer*. Biocontrol in Plant Protection 01 2(1): 69-79. (in Persian)

Tajkarimi M, Ibrahim S, Cliver D (2010) Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control 21(9): 1199-1218.

Tripathi P, Dubey NK, Shukla AK (2008) Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mold of grapes caused by *Botrytis cinerea*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24: 39-46.

Vagelas I, Papachatzis A, Kalorizou H, Wogiatzi E (2009) Biological control of *Botrytis cinerea* fruit rot (Gray mold) on strawberry and red pepper by olive oil mill wastewater. Biotechnology and Biotechnological Equipment 23(4): 1489-1491.

Wilkinson JB (1994) Harry's Cosmeticology, Longman Scientific and Technical, 588-625.

Will F, Kruger E (1999) Fungicide residues in strawberry processing. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47(3): 858-61.

Ziedan EHE, Farrage ESH (2008) Fumigation of peach fruits with essential oils to control postharvest decay. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 4(5): 512-519.