

بررسی خاصیت ضدقارچی نانوامولسیون اسانس برخی گیاهان دارویی در کنترل پوسیدگی نرم توت‌فرنگی ناشی از *Rhizopus stolonifer*

فرزانه سیفی، محسن فرزانه، حسن رفعتی، حسن رضادوست

پژوهشکده‌ی گیاهان و مواد اولیه‌ی دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین-تهران

مسئول مکاتبات: محسن فرزانه، پست الکترونیکی: M_farzaneh@sbu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۵

۷۹-۶۹(۱)۲

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۶

چکیده

هرچند قابلیت برخی اسانس‌های گیاهان دارویی به‌عنوان قارچ‌کش شناخته شده است اما ضمن دشواری‌هایی در کاربرد، دارای اثرات ارگانولپتیک (organoleptic) نیز بوده و در محصولات ایجاد بو و مزه می‌کنند. یکی از روش‌های به‌حد اقل رساندن این معایب اسانس‌ها، استفاده از نانوامولسیون آن‌هاست که ضمن پایداری باعث افزایش خواص ضد میکروبی از طریق افزایش جذب سلولی می‌شود. در تحقیق حاضر، نانوامولسیون اسانس سه گیاه دارویی نعنا فلفلی (*Mentha piperita*)، آویشن دنیایی (*Thymus daenensis*) و مرزه‌ی خوزستانی (*Satureja khuzistanica*) تهیه و اندازه‌ی ذرات آن‌ها مشخص شد. ترکیب اصلی در اسانس‌های آویشن دنیایی و مرزه‌ی خوزستانی به ترتیب شامل تیمول (۶۴/۸ درصد) و کارواکرول (۷۲/۴ درصد) بود در حالی که منتول (۳۶/۵ درصد) و منتون (۳۳/۸ درصد)، مهمترین ترکیبات موجود در اسانس نعنا فلفلی بودند. اسانس‌ها و نانوامولسیون آن‌ها به همراه قارچ‌کش تیابندازول در غلظت‌های مختلف (یک، دو و چهار در هزار) در کنترل قارچ *Rhizopus stolonifer*، عامل پوسیدگی میوه‌ی توت‌فرنگی مورد مطالعه قرار گرفتند. به‌طور کلی، نانوامولسیون اسانس‌ها خاصیت ضدقارچی بیشتری نسبت به اسانس‌ها داشتند. در غلظت چهار در هزار، اسانس و نانوامولسیون مرزه‌ی خوزستانی پوسیدگی میوه را به‌طور کامل متوقف کرد و فعالیت ضدقارچی بیشتری نسبت به قارچ‌کش تیابندازول (۸۵/۸۳ درصد کنترل) نشان داد. بین تیابندازول با نانوامولسیون اسانس‌های آویشن دنیایی و نعنا فلفلی تفاوت معنی‌دار در کاهش بیماری مشاهده نشد. در غلظت دو در هزار نیز نانوامولسیون مرزه با ۵۰ درصد کنترل، تأثیر معنی‌داری در کاهش پوسیدگی نشان داد. در پایان، نانوامولسیون اسانس‌ها به‌خصوص اسانس مرزه برای ساخت قارچ‌کش‌های طبیعی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: نانوامولسیون، نعنا، آویشن، مرزه، پوسیدگی نرم توت‌فرنگی، کنترل

مقدمه

به‌طوری‌که با ایجاد صدمات فیزیکی و یا تغییرات فیزیولوژیکی، بستری مناسب برای توسعه انواع قارچ‌ها خواهد بود (Behnamian & Masiha, 2002). پوسیدگی نرم ناشی از قارچ (*Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill یکی از مهمترین بیماری‌های پس از برداشت در توت‌فرنگی بوده که در سایر میوه‌ها نیز بیماری ایجاد می‌کند و عمده خسارت آن به میوه‌ی توت‌فرنگی، به‌مراحل بعد از برداشت و در طی مراحل انبارداری یا حمل و نقل مرتبط می‌باشد. روش معمول در کنترل این بیماری، استفاده از سموم شیمیایی است (Barki-Golan, 2001; Knight et al.,

توت‌فرنگی با نام علمی *Fragaria ananassa* Duchesne یکی از اعضای خانواده‌ی Rosaceae است (Dris et al., 2001). کیفیت این میوه به وضعیت ظاهری، بافت، عطر، طعم و ارزش تغذیه‌ای آن بستگی دارد. قندها، اسیدهای آلی و ترکیبات معطر در طعم توت‌فرنگی نقش مهمی دارند (Dris et al., 2001). میوه‌ی توت‌فرنگی به دلیل دارا بودن مقدار بالای آب میان بافتی و نیز به دلیل تنفس و فعالیت متابولیکی بیش از اندازه، در طی زمان برداشت تا مصرف در برابر عوامل میکروبی بسیار حساس بوده،

خوشایند مصرف کنندگان نمی‌باشد، بنابراین امروزه تلاش می‌شود تا اثرات نامطلوب اسانس‌ها کاسته شود. یکی از روش‌های به‌حداقل رساندن این اثرات نامطلوب، استفاده از نانوامولسیون آن‌هاست که سبب افزایش پایداری ترکیبات فرار، محافظت آن‌ها در برابر اثرات متقابل با سایر ترکیبات و افزایش خواص ضد میکروبی از طریق افزایش جذب سلولی می‌شود (Donsi *et al.*, 2011). نانو امولسیون اسانس‌ها از نظر خصوصیات ساختاری و فیزیکی با امولسیون آن‌ها تفاوت دارند. استفاده از کمک حلال‌ها در تهیه‌ی نانو ذرات اسانس‌ها، منجر به تولید فرمولاسیونی با ویسکوزیته و پایداری مناسب می‌شود. علاوه بر این، کوچک بودن اندازه‌ی ذرات نیز برای افزایش پایداری و نیمه عمر ماده مؤثره و سهولت رسیدن به موضع اثر بسیار مورد توجه می‌باشد (Mason *et al.*, 2006).

در این تحقیق سعی شده است که تأثیر نانوامولسیون‌های گیاهان دارویی مرزهی خوزستانی، آویشن دنیایی و نعناقلی بر کنترل پوسیدگی ریزوپوسی میوه توت‌فرنگی در شرایط اتاق بررسی گردد تا در صورت حصول نتایج مطلوب، بتوان از آن‌ها به‌عنوان جایگزین‌های قارچ‌کش‌های شیمیایی در کاهش ضایعات پس از برداشت میوه‌ی توت‌فرنگی استفاده گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی مواد گیاهی و استخراج اسانس

در اواسط خرداد ماه ۱۳۹۱ مواد گیاهی گونه‌های مورد آزمایش شامل پیکره‌ی رویشی آویشن دنیایی، *Thymus daenensis* Celak و مرزهی خوزستانی، *Satureja khuzistanica* Jamzad به ترتیب از رویشگاه صالح آباد استان ایلام (صالح آباد: ارتفاع از سطح دریا ۴۰۰ متر، عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و ۲۸ دقیقه و ۴۶ ثانیه و طول جغرافیایی ۴۶ درجه و ۱۰ دقیقه و ۵۹ ثانیه) و ماژین استان لرستان (ماژین: ارتفاع از سطح دریا ۴۹۰ متر، عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و صفر دقیقه و ۴۴ ثانیه و طول جغرافیایی ۴۷ درجه و ۲۰ دقیقه و ۱۹ ثانیه) تهیه شد. پیکره‌ی رویشی نعناقلی، *Mentha piperita* L. از مزرعه‌ی تحقیقاتی پژوهشکده‌ی

(Narayanasamy, 2006; 1997) که ضمن اثرات سوء زیست محیطی، بقایای آن‌ها نیز در میوه‌های توت‌فرنگی باعث خطرانی برای سلامتی انسان‌ها می‌شود (Will & Kruger, 1999). تحقیقات نشان داده‌است که گیاهان معطر متعلق به خانواده‌های نعناعیان، کاسنی و چتریان غنی از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان‌ها هستند (Carson *et al.*, 2006; Gyawali & Ibrahim, 2014). این مواد ضمن سمیت بسیار پایین برای پستانداران و مقبولیت بالا نزد اغلب مردم (Don-pedro, 1996; Hamilton-Kemp *et al.*, 2000; Paranagama *et al.*, 2003; Paster *et al.*, 1995)، اثرات جانبی کمتری نسبت به مواد شیمیایی داشته و کیفیت میوه و طول دوره‌ی انبارمانی آن را افزایش می‌دهند (Tajkarimi *et al.*, 2010; Hyldgaard *et al.*, 2012). گروه‌های اصلی این ترکیبات با خاصیت ضد قارچی، شامل ترپن‌ها، تانن‌ها (Tannins)، فلاونوئیدها (Flavonoids)، اسانس‌ها، آلکالوئیدها (Alkaloids)، لکتین‌ها (Lectins) و پلی‌پتیدها می‌باشند (Gyawali & Ibrahim, 2014). در بین این ترکیبات از اسانس‌ها به دلیل تأثیرگذاری در فاز بخار، بیشتر از سایر ترکیبات ضد میکروبی استفاده می‌شود به طوری که امکان کنترل بیماری‌های پس از برداشت محصولات کشاورزی و غذایی را به صورت تدخینی نیز فراهم می‌کند (Paster *et al.*, 1995; Hammer *et al.*, 1999; Tripathi *et al.*, 2008). خاصیت ضد قارچی اسانس‌ها نیز به برخی ترکیبات آن‌ها از قبیل کارواکرول (Carvacrol)، منتول (Menthol)، سیمن (Cymene)، تیمول (Thymol)، سینام‌آلدهید (Cinnamaldehyde)، اوژنول (Eugenol)، پینن (Pinene) و لینالول (Linalool) مرتبط است که به‌عنوان ترکیبات با تأثیر بالای ضدقارچی شناخته می‌شوند (Knobloch *et al.*, 1985; Juven *et al.*, 1994; Harborne *et al.*, 1995; Cimanga *et al.*, 2002).

مصرف اسانس‌ها به طور کلی به دلیل محلولیت پایین در آب، فشار بخار بالا و ناپایداری فیزیکی و شیمیایی با دشواری‌هایی در کاربرد همراه است. علاوه بر این، اسانس‌ها در محصولات ایجاد بو و مزه می‌کنند که این امر مورد

نانوامولسیون‌های حاوی ۱۰٪ اسانس تهیه شد. برای تهیه‌ی نانوامولسیون‌ها از پلی وینیل الکل (Polyvinyl alcohol) توین ۸۰ (Tween 80) و ولسیتین (Lecithin) استفاده شد. در انتها، ظروف حاوی نانوامولسیون‌ها به‌خوبی پوشانده شده و در دمای یخچال و دور از نور نگهداری شدند.

تعیین اندازه‌ی ذره‌ای نانو امولسیون‌ها:

اندازه‌ی ذره‌ای نانوامولسیون‌های تهیه شده به‌وسیله‌ی دستگاه DLS (Dynamic Light Scattering) تعیین شد. همچنین محدوده‌ی توزیع ذرات به کمک دستگاه به‌دست آمد (Ghaderi, 2014).

تهیه‌ی زادمایه بیمارگر

قارچ عامل پوسیدگی پس از برداشت میوه‌ی توت‌فرنگی *R. stolonifer* SBU204 از کلکسیون میکروبی پژوهشکده‌ی گیاهان و مواد اولیه‌ی دارویی دانشگاه شهید بهشتی دریافت شد. برای تهیه‌ی زادمایه جدایه‌ی مورد نظر، از کشت یک هفته‌ای قارچ که روی محیط PDA کشت داده شده بود و در شرایط ۲۵ درجه‌ی سلسیوس با دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شد، استفاده شد. سوسپانسیون اسپور در آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۸۰ تهیه شد و سپس به کمک هماسیتومتر، به غلظت 10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون تعیین شد.

بررسی خاصیت ضد قارچی روی میوه‌ی

توت‌فرنگی

میوه‌های توت‌فرنگی (یکسان از نظر اندازه و شاخص رسیدگی) رقم سلوا (Selva) فاقد هر گونه عارضه فیزیکی و شیمیایی از گلخانه‌ای واقع در شهر جدید هشتگرد استان البرز تهیه شد. برای ضدعفونی سطحی، میوه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور شده و سپس دوبار با آب مقطر سترون شستشو داده شد و پس از خشک شدن در شرایط سترون در سوسپانسیون اسپور قارچ *R. stolonifer* به غلظت 10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون به‌مدت یک دقیقه فروبرده شدند. سپس غلظت‌های یک، دو و چهار در هزار از هر یک از اسانس‌ها در آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۸۰ و از هر

گیاهان و مواد اولیه‌ی دارویی دانشگاه شهید بهشتی واقع در ولنجک تهران تهیه شد. هر یک از نمونه‌ها پس از خشک شدن در سایه، به‌وسیله آسیاب خرد شده و سپس اسانس آن‌ها به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر (Clevenger) به‌مدت سه ساعت استخراج شد. اسانس برای هر نمونه در سه تکرار و برای هر تکرار ۵۰ گرم نمونه گیاهی استفاده شد. اسانس به‌دست آمده به‌وسیله‌ی سولفات سدیم خشک آب‌گیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس داخل یخچال تا زمان آنالیز و بررسی آزمون ضد قارچی نگهداری شد.

آنالیز و شناسایی ترکیب‌های اسانس

اسانس‌های به‌دست آمده از هر سه گونه گیاهی با دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی همراه با طیف سنجی جرمی (GC-MS) مورد شناسایی قرار گرفتند. در ابتدا اسانس استخراج شده از هر سه تکرار برای هر گونه گیاهی مخلوط شد و یک میکرولیتر از آن به دستگاه GC تزریق شد و پس از یافتن برنامه‌ریزی مناسب حرارتی ستون برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس و تعیین درصد و زمان بازداری هر ترکیب، از هر گونه گیاهی یک میکرولیتر اسانس به دستگاه GC-MS تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها تعیین شد. شناسایی ترکیب‌ها براساس شاخص بازداری و مقایسه‌ی طیف جرمی آن‌ها با ترکیب‌های پیشنهادی کتابخانه دستگاه انجام گرفت. درصد هر ترکیب با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام حاصل از دستگاه GC با روش نرمال کردن سطح منحنی و بدون محاسبه عامل تصحیح انجام شد (Adams, 1995).

تهیه‌ی فرمولاسیون نانو امولسیون اسانس

فرمولاسیون نانوامولسیون اسانس‌ها، از گروه مهندسی شیمی پژوهشکده‌ی گیاهان و مواد اولیه‌ی دارویی دریافت شد (Ardalan, 2014; Ghaderi, 2014; Pourhossein-). (Alamdary, 2012). برای تهیه‌ی نانو ذرات از دستگاه پروب شرکت امواج فراصوت، با ژنراتور مدل MTI سوئیس، ۴۰۰ وات، ۲۲۰ ولت، فرکانس ۲۰/۵ کیلوهرتز، دامنه‌ی ۳۰ درصد و قطر پروب ۱۹ سانتی‌متر استفاده شد.

نتایج

ترکیبات عمده‌ی اسانس‌های مورد آزمایش

ترکیب‌های اصلی در اسانس آویشن دناپی شامل تیمول ۸ (۶۴/۱ درصد)، آلفا-تریپنین (۱۱/۳ درصد) و پارا-سیمن (۷/۹ درصد) بود (جدول ۱). ترکیب‌های اصلی در اسانس گونه‌ی مرزه‌ی خوزستانی شامل کارواکرول (۷۲/۴ درصد)، پارا-سیمن (۳/۵ درصد) و گاما-تریپنین (۱۱ درصد) می‌باشد (جدول ۲). متول (۳۶/۵ درصد) و متون (۳۳/۸ درصد)، مهمترین ترکیبات موجود در اسانس نعناقللی بودند (جدول ۳).

جدول ۱- نوع و درصد ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس

آویشن دناپی، *Thymus danensis* با استفاده از GC-MS

Table 1- Constituents of chemical composition of *Thymus danensis* essential oil by GC-MS.

	Compounds	RI*	Concentrations (%)
1	alpha-thujene	925	0.8
2	alpha-pinene	933	1.1
3	camphene	947	0.1
4	beta-pinene	974	0.7
5	myrcene	981	1.2
6	alpha-phelandrene	999	0.2
7	para-cymene	1014	7.9
8	cis-sabinene hydrate	1056	0.3
9	alpha-terpinene	1080	11.3
10	trans-sabinene hydrate	1055	0.1
11	4.5-epoxy-carane	1151	0.1
12	terpin-4-ol	1163	0.3
13	alpha-terpineol	1175	0.1
14	thymyl methyl ether	1225	0.1
15	thymol	1266	64.8
16	carvacrol	1282	0.9
17	4-terpinyl acetate	1296	0.2
18	carvacryl acetate	1345	2.8
19	beta-caryophyllene	1424	3.5
20	alpha-humulene	1427	0.1
21	beta-bisabolene	1501	1.2
22	spathulenol	1576	0.1
	Total	-	97.9

* RI, retention indices relative to C₆ - C₂₄n-alkanes on the DB-1 column

* شاخص بازداری (Retention Indices) به نسبت خروج آلکان‌های C₆ - C_{24n} روی ستون DB-1 برآورد شده است.

بررسی پراکنش اندازه ذرات نانومولسیون تهیه شده

شده

اندازه ذره‌ای نانومولسیون‌های تهیه شده به وسیله

دستگاه DLS تعیین شد. نتایج حاصله در جدول چهار نشان

یک از نانومولسیون‌ها در آب مقطر سترون تهیه شد و میوه‌های مایه زنی شده، به روش محلول پاشی تیمار شدند.

قارچ کش تیابندازول (Tecto) Thiabendazole

(60®) (تکتو ۶۰) در آب مقطر سترون (در غلظت‌های

یک، دو و چهار در هزار) به‌عنوان شاهد به کار برده شد.

دیگر تیمارهای شاهد شامل شاهد آلوده (میوه‌های سالم مایه

زنی شده با اسپور بیمارگر + محلول پاشی با آب مقطر

سترون حاوی ۰/۵ درصد توین ۸۰) و شاهد سالم (میوه‌های

سالم + محلول پاشی با آب مقطر سترون حاوی ۰/۵ درصد

توین ۸۰) بودند. هر پنج عدد میوه (Lee et al., 2007)

به‌عنوان یک تکرار در یک ظرف پلاستیکی شفاف به ابعاد

۱۴*۱۱*۴ سانتی‌متر قرار داده شد (Reddy et al., 1997).

آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۳

تکرار انجام شد. درصد پوسیدگی در میوه‌های توت‌فرنگی

پس از پنج و ۱۰ روز نگهداری آن‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی

سلسیوس اندازه‌گیری شد. آلودگی هر میوه بر اساس میزان

لهیدگی و پوسیدگی سطح میوه بود بدین صورت که هر میوه

به هشت قسمت تقسیم شده و مشاهده علائم بیماری در هر

قسمت برابر با ۱۲/۵ درصد برآورد شد (Huang et al., 2011).

به عبارتی شدت بیماری میوه‌های توت‌فرنگی آلوده شده بین

۰ تا ۸ ارزیابی شد. عدد صفر نشان‌دهنده‌ی میوه سالم و

اعداد ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ به ترتیب نشان‌دهنده‌ی

پوسیدگی کمتر از ۱۲/۵٪، بین ۱۲/۵ تا ۲۵٪، بین ۲۵ تا

۳۷/۵٪، بین ۳۷/۵ تا ۵۰٪، بین ۵۰ تا ۶۲/۵٪، بین ۶۲/۵ تا ۷۵٪،

بین ۷۵ تا ۸۷/۵٪ و بیش از ۸۷/۵٪ می‌باشد. 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 تجزیه داده‌ها از دو نرم افزار به تفکیک کارهای

مورد نیاز بهره برده شد. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها به‌وسیله‌ی

نرم افزار Minitab بررسی شد. برای تجزیه‌ی واریانس از نرم

افزار SAS طبق رویه‌ی GLM استفاده شد. پس از تجزیه‌ی

واریانس، میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح

احتمال ۵٪ مقایسه شدند.

جدول ۳- نوع و درصد ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس نعنا فلفلی (*Mentha piperita*) با استفاده از GC-MS.

Table 3- Constituents of chemical composition of *Mentha piperita* essential oil by GC-MS.

Compounds	RI*	Concentrations (%)
1,8-cineole	1028	10.9
linalool	1089	0.4
menthone	1152	33.8
morneol	1155	1.3
isomenthone	1158	4.0
menthofuran	1162	3.6
menthol	1180	36.5
pulegone	1226	0.1
lavandulyl acetate	1272	0.1
phellanderol	1267	0.2
menthyl acetate	1282	1.7
beta-caryophyllene	1426	0.2
cis-caryophyllene	1427	2.6
germacrened	1447	2.5
Total		97.9

*RI, Retention Indices relative to C₆ - C₂₄ n-alkanes on the DB-1 column

*شاخص بازداری (retention indices) به نسبت خروج آلکان های C₆ - C₂₄ روی ستون DB-1 برآورد شده است.

جدول ۴- میانگین اندازه‌ی ذره‌ای و توزیع اندازه‌ی ذره‌ای نانو

امولسیون‌ها (بر حسب نانومتر) به دست آمده از دستگاه DLS

Table 4- Mean diameter and distribution of particle size of three essential oils nano-emulsions (nm) by DLS.

Nano-emulsion	Mean diameter of particle size (nm)	Particle size distribution (nm)
<i>Satureja khuzistanica</i>	396.66±15.71	121.75±40.11
<i>Mentha piperita</i>	218.88±18.75	44.33±18.46
<i>Thymus danensis</i>	180.29±4.24	27.7±7.13

نتایج حاصل از بررسی اسانس و نانو امولسیون اسانس‌ها روی میوه پس از پنج روز انبارداری نشان داد اسانس و نانو امولسیون اسانس مرزه در غلظت چهار در هزار بیشترین تأثیر را در کاهش پوسیدگی ریزوپوسی میوه‌ی توت‌فرنگی داشته و به‌طور کامل از ایجاد پوسیدگی ممانعت کردند. در تیمار نانو امولسیون مرزه در غلظت دو در هزار، ۵۰ درصد آلودگی مشاهده شد. در تیمار تیابندازول کمترین میزان آلودگی در غلظت چهار در هزار و به میزان ۸۵/۸۳ درصد

داده شده است. طبق جدول، میانگین اندازه‌ی ذرات نانو امولسیون آویشن دناپی کوچکتر از میانگین اندازه‌ی ذرات مرزه و نعنا فلفلی می‌باشد. محدوده‌ی توزیع اندازه‌ی ذره‌ای نیز در نانو امولسیون آویشن کمترین است.

جدول ۲- نوع و درصد ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس مرزه (*Satureja khuzistanica*) با استفاده از GC-MS.

Table 2- Constituents of chemical composition of *Satureja khuzistanica* essential oil by GC-MS

Compounds	RI*	Concentration (%)
alpha-thujene	925	1.2
alpha-pinene	933	1.6
camphene	947	0.1
beta-pinene	974	1.2
myrcene	981	1.7
alpha-phelandrene	999	0.2
para-cymene	1014	11.0
1,8-cineole	1023	0.7
gama-terpinene	1053	3.5
cis-sabinene hydrate	1056	0.2
linalool	1085	0.2
trans-sabinene hydrate	1055	0.2
trans-2-carene-4-ol	1145	0.1
terpin-4-ol	1163	0.5
alpha-terpineol	1175	0.2
thymol	1266	0.3
carvacrol	1282	72.4
carvacryl acetate	1345	2.1
beta-caryophyllene	1424	0.4
beta-bisabolene	1501	0.7
spathulenol	1576	0.1
caryophyllene oxide	1960	0.3
Total	-	98.9

*RI, Retention Indices relative to C₆ - C₂₄ n-alkanes on the DB-1 column

*شاخص بازداری (Retention Indices) به نسبت خروج آلکان های C₆ - C₂₄ روی ستون DB-1 برآورد شده است.

بررسی غلظت‌های مختلف نانو امولسیون اسانس‌ها در جلوگیری از میزان پوسیدگی نرم میوه توت‌فرنگی پس از پنج و ده روز نگهداری در تاریکی و دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس

باتوجه به نتایج به دست آمده (جدول‌های ۵ و ۶) پس از هر دو دوره نگهداری، از نظر پوسیدگی میوه، بین هر سه اسانس و نانو امولسیون آن‌ها، اختلاف معنی‌داری وجود داشت. پس از پنج روز انبارداری، میزان پوسیدگی نرم میوه در تیمارهای شاهد سالم و آلوده به ترتیب ۸/۳۳ و ۱۰۰ درصد بود.

(۸/۳۴٪ آلودگی) و اسانس مرزه (۲۵٪ آلودگی) مشاهده شد که با سایر تیمارها تفاوت معنی دار نشان دادند (جدول ۶).

بحث

تولید و مصرف گیاهان دارویی در صنایع دارویی و غذایی به علت دارا بودن ترکیبات فعال بیولوژیک رو به گسترش می‌باشد. علاوه بر این تحقیقات گسترده‌ای آغاز گردیده که نشان می‌دهند، متابولیت‌های ثانویه برخی گیاهان دارویی در جلوگیری از رشد قارچ‌های بیمارگر گیاهی مؤثر بوده 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 شده‌است (Ziedan & 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، زیره سبز، مرزه، نعنا فلفلی و آویشن در کنترل *Botrytis 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 شستشوی سبزیجات، موفقیت زیادی در کنترل کپک‌ها و بیمارگرهای سبزیجات داشته است (Burt, 2004; Goni et al., 2009). در تحقیق حاضر نیز اسانس مرزه‌ی خوزستانی فعالیت ضد قارچی قابل توجهی در کنترل پوسیدگی رازیوپوسی میوه توت‌فرنگی نشان داد. اثر اسانس‌ها در جلوگیری از رشد قارچ مربوط به وجود مواد مؤثره آن‌هاست. نتایج آنالیز اسانس‌ها نشان داد که اسانس مرزه دارای ۷۲٪ کارواکرول، ۳/۵٪ گاما-ترپین و ۱۱٪ پارا-سیمن است. همچنین در اسانس آویشن دنیایی، تیمول (۶۴/۸٪)، آلفا-ترپین (۱۱/۳٪) و پارا-سیمن (۷/۹٪) و در اسانس نعنا فلفلی منتول (۳۶/۵٪) و منتون (۳۳/۸٪) ترکیبات عمده می‌باشند. مشابه تحقیق ما ترکیبات اصلی موجود در گیاهان مرزنجوش، مرزه و آویشن به ترپن‌ها،

مشاهده شد که با نتایج تیمارهای نانوامولسیون‌های آویشن و نعنا فلفلی تفاوت معنی دار نداشت (جدول ۵).

جدول ۵- درصد بازدارندگی میزان پوسیدگی میوه‌ی توت‌فرنگی ناشی از *Rhizopus stolonifer* در حضور غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس‌های سه گیاه دارویی پس از پنج روز نگهداری در تاریکی و دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس.

Table 5- Percent of inhibition of strawberry fruit rot, *Rhizopus stolonifer* by three concentrations of nano-emulsion essential oils of three medicinal plants, 5 days after incubation in dark condition at 25°C.

Treatments	Concentrations		
	1:1000	2:1000	4:1000
<i>T. daenensis</i>	0j	8.34h	17.5f
<i>T. daenensis</i> (Nano)	0j	6.7h	15fg
<i>S. khuzistanica</i>	26.66e	45c	100a
<i>S. khuzistanica</i> (Nano)	34.17d	50b	100a
<i>M. piperita</i>	0j	8.34h	15g
<i>M. piperita</i> (Nano)	1.70ij	8.34h	14.17g
Thiabendazole	3.34i	6.67h	14.17g

Mean values followed by the same letter are not significantly different using LSD range test ($P < 5\%$).

*میانگین‌های دارای حروف مشترک براساس آزمون LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

جدول ۶- میزان کنترل پوسیدگی میوه‌ی توت‌فرنگی ناشی از *R. stolonifer* در حضور غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس‌های سه گیاه دارویی پس از ۱۰ روز نگهداری در تاریکی و دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس.

Table 6- Control of *Rhizopus* fruit rot in strawberry by nano-emulsions of three medicinal plants essential oils (at different concentrations) after 10 days incubation in the dark condition at 25 °C.

Treatments	Inhibition of strawberry fruit rot (%)	
	1:1000	2:1000
<i>T. daenensis</i>	0d	0d
Nano-emulsion of <i>T. daenensis</i>	0d	0d
<i>S. khuzistanica</i>	0d	8.33c
Nano-emulsion of <i>S. khuzistanica</i>	0d	8.33c
<i>M. piperita</i>	0d	0d
Nano-emulsion of <i>M. piperita</i>	0d	0d
Thiabendazole	0d	0d

Mean values followed by the same letter are not significantly difference according to LSD test at 5% significance level.

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون LSD فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند

پس از ده روز انبارداری، کمترین میزان پوسیدگی نرم در غلظت چهار در هزار تیمار نانوامولسیون مرزه

کامل تا پنج روز بعد از کاربرد متوقف کند. به علاوه، بین نانومولسیون‌های آویشن دناپی و نعنافللی با قارچ کش تبايندازول تفاوت معنی داری وجود نداشت. مشابه نتایج ما، کارایی مؤثر نانومولسیون اسانس‌های دارچین، مرزه‌ی خوزستانی و آویشن دناپی در کنترل باکتری‌های بیمارگر انسانی به اثبات رسیده است (Ardalan, 2014; Ghaderi, 2012; Pourhossein-Alamdary, 2012). استفاده از کمک حلال‌ها در تهیه‌ی نانو ذرات اسانس‌ها، منجر به تولید فرمولاسیونی با ویسکوزیته و پایداری مناسب می‌شود (Mandal & Bera, 2012). علاوه بر این، کوچک بودن اندازه‌ی ذرات نیز برای افزایش پایداری و نیمه عمر ماده‌ی مؤثره و سهولت رسیدن به موضع اثر بسیار مورد توجه می‌باشد (Mason *et al.*, 2006).

نانومولسیون‌ها به عنوان سیستم‌های انتقال مواد چربی دوست در صنایع دارو سازی، به عنوان طعم دهنده و مواد آنتی‌باکتریال در صنایع غذایی، حل کردن آفت کش‌های نامحلول در آب در صنایع کشاورزی و به عنوان حامل‌های مراقبت از پوست و محصولات شخصی در صنایع آرایشی-بهداشتی به کار می‌روند (Ghosh *et al.*, 2013). این ذرات با دیواره‌ی سلولی بیمارگر آمیخته می‌شوند و تخریب آن‌ها را آغاز می‌کنند. این مکانیسم غیر تخصصی سبب ایجاد مقاومت در سویه‌ها نیز نمی‌شود. از طرفی در مورد کاربردی شدن اسانس‌ها به عنوان قارچ کش‌های گیاهی، تهیه سیستم همگن آبی پایدار حاوی اسانس به منظور تسهیل استفاده تجاری آن ضروری است و سهولت کاربرد به واسطه رقیق‌سازی سریع امولسیون مادر در آب توسط کشاورز و دیگر مصرف کنندگان امکان پذیر می‌شود.

در پایان براساس نتایج این پژوهش، نانومولسیون مرزه‌ی خوزستانی جهت کنترل قارچ‌های انباری میوه توت فرنگی در شرایط پس از برداشت پیشنهاد می‌شود تا پس از مطالعه‌ی کامل اثرات آن روی خصوصیات کیفی میوه و حصول نتایج مطلوب (هم اکنون در حال بررسی است)، به عنوان جایگزین قارچ کش‌های شیمیایی پرمصرف در کاهش ضایعات پس از برداشت میوه‌ی توت فرنگی، به صورت تجاری تولید شده و مورد استفاده قرار گیرد.

کارواکرول، پارا-سیمن و تیمول شناسایی شده و خاصیت ضدقارچی و ضد میکروبی آن‌ها ثابت شده است که اخیراً به خاطر موقعیت سلامت توجه زیادی را در صنایع غذایی به خود جلب کرده‌اند (Bendahou *et al.*, 2008; Tajkarimi *et al.*, 2010). بنابراین اسانس‌های گیاهان مورد بررسی دارای ترکیب‌هایی با پتانسیل ضد قارچی بوده و در صورت فرمولاسیون مطلوب می‌توانند به عنوان جایگزین قارچ کش‌های سنتزی در کنترل آلودگی‌های قارچی روی محصولات کشاورزی در مرحله پس از برداشت مورد استفاده قرار گیرند.

متأسفانه مصرف اسانس‌ها عموماً به دلیل محلولیت پایین در آب، فشار بخار بالا و ناپایداری فیزیکی و شیمیایی با دشواری‌هایی در کاربرد همراه است. علاوه بر این، اسانس‌ها دارای اثرات ارگانولپتیک نیز بوده و در محصولات ایجاد بو و مزه می‌کنند (Hyldgaard *et al.*, 2012). یکی از روش‌های به حداقل رساندن این اثرات، استفاده از نانومولسیون آن‌هاست که با توجه به کوچک‌تر بودن اندازه‌ی ذرات در افزایش پایداری و نیمه عمر ماده مؤثره و سهولت رسیدن به موضع اثر نقش مهمی دارد. فزون بر این ضمن سهولت کاربرد (امولسیون شدن آسان و سریع)، باعث افزایش خواص ضد میکروبی از طریق افزایش جذب سلولی می‌شود (Donsi *et al.*, 2011). از طرفی اندازه‌ی ذره‌ی نانومولسیون معیاری برای میزان پایداری آن است، هرچه اندازه‌ی ذره‌ی بزرگ‌تر و محدوده توزیع اندازه ذره‌ی حاصل بیشتر باشد نانومولسیون ناپایدارتر است، چون ذرات بزرگ‌تر به هم پیوسته و تجمع پیدا می‌کنند و باعث ناپایداری نانومولسیون می‌شوند (Wilkinson, 1994). در این تحقیق توزیع اندازه‌ی ذرات نانو امولسیون اسانس‌ها بین ۱۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر بوده که نشان از پایداری آن‌ها می‌باشد.

در تحقیق حاضر در اغلب موارد نانومولسیون اسانس در مقایسه با اسانس، فعالیت ضد قارچی بیشتری در کنترل پوسیدگی نرم میوه توت‌فرنگی نشان داد. از طرفی نانومولسیون اسانس مرزه‌ی خوزستانی در مقایسه با سایر نانومولسیون‌ها از قدرت بازدارندگی بیشتری برخوردار بود و توانست در غلظت چهار در هزار رشد قارچ را به طور

است که بدین وسیله نگارندگان مراتب تشکر خود را ابراز می دارند

سپاسگزاری

بودجه و امکانات این تحقیق از محل پژوهش‌های کاربردی تقاضا محور معاونت پژوهشی و فناوری وزارت علوم، تحقیقات و فناوری (طرح شماره ۲۷۳۹) تأمین شده

References

- Adams, R.P. 1995.** Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass spectroscopy. Allured Publishing. Carol stream. IL, 404.
- Ardalan, F. 2014.** Formulation of nano-emulsions 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.
- Behnam, S., Farzaneh, M., Ahmadzadeh, M. & Tehrani, A. S. 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 Publication, Tabriz, Iran. (in Persian).
- Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J.M. & Bernardini, A.F. 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, L.M. & Hmamochi, M. 2003.** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan 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.
- Carson, C.F., Hammer, K.A. & Riely, T.V. 2006.** *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: Rev. Antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology*, 19: 50-62.
- Charles, A., Onyeani, S.O., Osunlaja, O. O. & Oworu, A.O. 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, L.M. 2004.** Composition and in vitro fungitoxic activity of 19 essential oils against two post-harvest pathogens. *Journal of Essential Oils Research*, 16: 507-511.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T. & Hermans, N. 2002.** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 213-220.
- Defera, D.J., Zigas, B.N. & Polission, M.G. 2002.** The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* sub sp. *Michiganensis*. *Crop Protection*, 22: 39-44.

- Don-Pedro, K.N. 1996.** Fumigant toxicity is the major rout of insecticidal activity of *citrus peel* essential oils. Pesticide Science, 46: 71–78.
- Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M. & Ferrari, G. 2011.** Nano-encapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. Food Science and Technology. 44: 1908–1914.
- Dris, R., Niskanen, R. & Jain, S.M. 2001.** Crop management and postharvest handling of horticultural products. Science Publishers, Enfield, NH.
- Farzaneh, M., Ranjbar, H., Hadian, J. & Mirjalili, M.H. 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 nano-emulsions from essential oil of *Thymus daenensis* in treatment of sinusitis. MSc thesis, Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, pp.96 (in Persian).
- Ghosh, V., Mukherjee, A. & Chandrasekaran, N. 2013.** Ultrasonic emulsification of food-grade nano-emulsion 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: 982–989.
- Gyawali, R. & Ibrahim, S.A. 2014.** Natural products as antimicrobial agents. Food Control. 46: 412–429.
- Hamilton-Kemp, T. R., Archbold, D. D., Louchrin, J. H., Andersen, R. A., McCracken, C. T. & Collins, R.W. 2000.** Stimulation and inhibition of fungal pathogens of plants by natural volatile phytochemicals and their analogs. Current Topics in Phytochemistry, 4: 95–104.
- Hammer, K. A., Carson, C. F. & Riely, T. V. 1999.** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology, 86: 985-990.
- Harborne, J. B. & Williams, C. A. 1995.** Anthocyanins and other flavonoids. Natural product research, 7: 639-657.
- Huang, R., Li, G.Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H.J., Jiang, D. H. & Huang, H. C. 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, R.L. 2012.** “Essential oils in food preservation: mode of action, ynergies, and interactions with food matrix components”. Frontiers in Microbiology, 3: 1-12.
- Juven, B. J., Kanner, J., Schaved, F. & Weisslowicz, H. 1994.** Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. Journal of Applied Bacteriology. 76: 626-631.
- Knight, S.C., Anthony, V.M., Brady, A.M., Geenland, A.J., Heaney, S.P., Murray, D.C., Powell, K.A., Schulz, M.A., Spinks, C.A., Worthington, P.A. & Youle, D. 1997.** Rationale and perspectives in the development of fungicides. Annual Review of Phytopathology, 35: 349-372.
- Knobloch, L., Weigand, H., Weis, N., Schwarn, H.M. & Vigenchqw, H. 1985.** Action of terpenoids on energy metabolism. pp. 429-448. In: Progress in Essential Oil Research. USA, Brunke, E.J. (ed.), Walter de Gruyter.

- Lee, S.O., Choi, G.J., Jang, K.S., Lim, H.K., Cho, K.Y. & Kim, J.C. 2007. Antifungal activity of five plants essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. *Plant Pathology Journal*, 23(2): 97-102.
- Mandal, A. & Bera, A. 2012. Surfactant stabilized nano-emulsion: Characterization and application in enhanced oil recovery. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 67: 21-26.
- Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B. & Graves, S. 2006. Nano-emulsions: 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.
- Paranagama, P.A., Abesekera, K.H.T., Abeywickrama, K., & Nugliyad, L. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemon-grass) against *Aspergillus flavus* Link. Isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 86-90.
- 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 nano-emulsions in treatment of sinusitis. MSc thesis, Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, pp.116. (in Persian).
- Ranjbar, H., Farzaneh, M., Hadian, J., Mirjalili M.H. & Sharifi R. 2008. Antifungal activity of the some essential oils on postharvest diseases of strawberry fruit. *Research & Reconstruction*, 81: 54-60. (in Persian).
- Reddy, M. V. B., 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.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S. & Cliver, D. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9): 1199-1218.
- Tripathi, P., Dubey, N.K. & Shukla, A.K. 2008. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould 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 & Biotechnological Equipment*. 23(4): 1489-1491.
- Wilkinson, J.B. 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, E.H.E. & Farrage, E.S.H. 2008. Fumigation of peach fruits with essential oils to control postharvest decay. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(5): 512-519.

Antifungal potency of some medicinal plants essential oils nano-emulsions to control soft rot in strawberry fruit caused by *Rhizopus stolonifer*

Farzaneh Seifi, Mohsen Farzaneh, Hassan Rafati, Hassan Rezadoost

Department of Chemical Engineering, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti G. C. Evin, Tehran, Iran

Corresponding author: Mohsen farzaneh, e-mail: m_farzaneh@sbu.ac.ir

Received: Aug. 17, 2014

2 (1) 69-79

Accepted: Nov. 26, 2014

Abstract

Although some of the medicinal plants essential oils were known as fungicide, but they are hard to use and have organoleptic effects to make smell and taste in crops. Nano-emulsion is a way to reduce these side effects and enhance stability as well as antimicrobial activity by increasing cellular uptake. In this investigation, the nano-emulsion of three essential oils; *Mentha piperita* (peppermint), *Thymus daenensis* (thyme) and *Satureja khuzistanica* (savory) were prepared and their particles size were determined. The major compound of thyme oil was thymol (68.8%) while carvacrol (72.4%) was identified as the major compound of savory. Menthol (36.5%) and menthone (33.8%) were identified as main compounds of peppermint. Three essential oils and their nano-emulsions as well as fungicide 'tiabendazole' were studied at various concentrations (1, 2 and 4 per1000) to control of *Rhizopus stolonifer* fruit rot in strawberry. Generally, nano-emulsions of essential oils showed more antifungal activity than essential oils. The nano-emulsion of savory oil could completely suppress the rot disease of fruits at the concentration of 4:1000 and showed stronger antifungal activity than fungicides tiabendazole (85.83%). There was no significant difference in decay control, between tiabendazole and nano-emulsions of thyme and peppermint. The nano-emulsion of savory oil at concentration of 2:1000 showed a significant effect in reducing fruit decay with 50% control. Finally, nano-emulsions of essential oils especially savory nano-emulsion are suggested for natural fungicide production.

Keywords: Nano-emulsion; Peppermint; Thyme; Savory; Soft rot of strawberry fruit; Control
