

بررسی سمیت تنفسی اسانس سه گیاه دارویی روی حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae)

آرزو حیدرزاده^۱، غلامحسین مروج^{۲*}، سعید هاتفی^۳ و جواد شباهنگ^۴
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار، مربی گروه گیاه پزشکی و
مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۱۸ - تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲)

چکیده

سمیت تنفسی اسانس گیاهان رازیانه *Foeniculum vulgare* Miller، کلپوره *Teucrium polium* Boiss. و مرزه *Satureja hortensis* L. روی سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات *Callosobruchus maculatus* F. در یک دوره زمانی ۲۴ ساعته مورد بررسی قرار گرفت. اسانس‌ها با استفاده از دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب تهیه شد. آزمایش‌ها در شرایط دمایی $28 \pm 2^\circ\text{C}$ و رطوبت نسبی $60 \pm 5\%$ درصد و در تاریکی انجام شد. از هر اسانس ۶ غلظت در ۶ تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. شناسایی ترکیبات اسانس‌ها با استفاده از روش GC-MS صورت گرفت. نتایج نشان داد که اصلی‌ترین ترکیبات در اسانس رازیانه، ترانس-انتول (۶۰/۶۱٪) و فینچون (۱۲/۱۴٪) و در اسانس کلپوره، پیریتنون اکساید (۲۱/۷۲٪)، آلفا پینن (۱۱/۳۳٪) و کارون (۱۱/۲۹٪) بود. کارواکرول (۵۰/۸۳٪) و تیمول (۲۷/۷۷٪) عمده‌ترین ترکیبات اسانس مرزه بودند. هر سه اسانس روی حشرات کامل سمیت تنفسی بالایی داشتند. مرگ‌ومیر حشرات کامل یک روزه در هر دو جنس نر و ماده با افزایش غلظت اسانس‌ها افزایش یافت. نسبت به کلیه اسانس‌ها، حشرات نر در مقایسه با حشرات ماده حساسیت بیشتری نشان دادند. اسانس رازیانه با LC_{50} معادل ۲۱/۳۱ و ۲۹/۴۵ میکرولیتر بر لیتر هوا به ترتیب علیه افراد نر و ماده، موثرتر از سایر اسانس‌های مورد بررسی بود. مقادیر LC_{50} برای اسانس کلپوره معادل ۵۴/۶۳ و ۸۰/۷۵ میکرولیتر بر لیتر هوا و برای اسانس مرزه معادل ۷۴/۳۶ و ۱۵۶/۶۶ میکرولیتر بر لیتر هوا به ترتیب علیه افراد نر و ماده بدست آمد. نتایج این بررسی، نشان‌دهنده پتانسیل بالای این اسانس‌ها به ویژه اسانس رازیانه در کنترل سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس‌های گیاهی، رازیانه، سمیت تنفسی، سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات، کلپوره، مرزه

برای جمعیت در حال افزایش است. حبوبات با دارا بودن متوسط ۲۰-۳۰٪ پروتئین غنی‌ترین و ارزان‌ترین منبع

مقدمه

از جمله مشکلات امروزی بشر، تهیه غذای کافی

مرسوم، در چند دهه اخیر پژوهش‌های گسترده‌ای به منظور توسعه ترکیبات جدید و غیر سمی و ترجیحاً با منشا گیاهی صورت گرفته است (Prakash & Rao, 2008; Viglianco *et al.*, 1997). استفاده از ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه گیاهی به دلیل برخورداری از ویژگی‌هایی چون مکانیسم عمل پیچیده و اختصاصی که مانع از بروز مقاومت در حشرات می‌شود به عنوان بهترین استراتژی جایگزین برای کنترل آفات انباری مطرح شده است (Talukder & Howse, 1994; Viglianco *et al.*, 2008). ترکیبات سمی گیاهی بدلیل طیف اثر محدود و قابلیت تجزیه به متابولیت‌های غیرسمی از پتانسیل بالایی برای کاربرد در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات برخوردار می‌باشند (Kim *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2003). گیاهان خانواده چتریان^۱ و نعناعیان^۲ از جمله گیاهان اسانس داری هستند که خواص حشره‌کشی آنها مورد تحقیق قرار گرفته است (Kim & Ahn, 2001; Chaubey, 2006, 2007, 2008; Golestani-Ilboudo *et al.*, 2010). بر اساس گزارش Kalat (2009) اسانس گیاهان اسطوخودوس *Lavandula angustifolia* Miller و آویشن شیرازی *Zataria multiflora* Bross. از خانواده نعناعیان سمیت تنفسی قابل توجهی روی حشرات کامل نر و ماده سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات داشتند. تأثیر حشره‌کشی اسانس‌های زنیان *Trachyspermum ammi* L. و زیره *Cuminum cyminum* L. از خانواده چتریان روی حشرات کامل سوسک چینی حیوانات *Callosobruchus chinensis* L. (1758) توسط Chaubey (2008) گزارش شد. مطالعات Keita *et al.* (2001) نشان داد که اسانس گونه‌های گیاهی نعناع آمریکایی *Hyptis suaveolens* Poit.، ریحان *Ocimum basilicum* L. و *Ocimum canum* Sims. از خانواده نعناعیان روی حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات سمیت تنفسی بالایی داشتند. در بررسی حاضر، اثرات حشره‌کشی اسانس گونه‌های گیاهی رازیانه *Foeniculum vulgare* Miller از خانواده چتریان و کلپوره *Teucrium polium* Boiss. و

پروتئین گیاهی محسوب می‌شوند. این فرآورده‌ها در تمام کشورهای استوایی و نیمه استوایی به عنوان یک ماده غذایی بعد از غلات بیشترین سطح زیر کشت را دارا هستند (Singh & Pandey, 2001; Kazemi *et al.*, 2009). بر اساس آمار سازمان خوار و بار کشاورزی (FAO) سطح زیر کشت حبوبات در سال‌های ۲۰۰۲-۲۰۰۴ میلادی ۷۱/۱۴-۶۷/۱۳ درصد بود. در سال‌های ذکر شده سطح زیر کشت حبوبات در ایران ۱/۵۴-۱/۱۵ میلیون هکتار بوده است (Nyaz-Ali, 2004). حبوبات طی نگهداری در انبار مورد حمله حشرات مختلف قرار می‌گیرند. سوسک چهار نقطه‌ای *Callosobruchus maculatus* F. یکی از مهم ترین آفات حبوبات انباری در سرتاسر دنیا است. لارو این آفت از محصولات مختلف نظیر برخی ارقام لوبیا، نخود، ماش، عدس، باقلا و غیره تغذیه کرده (Talukder & Howse, 1994; Raja *et al.*, 2001; Rahman & Talukder, 2006) و باعث کاهش وزن محصول، بازارپسندی، قدرت جوانه زنی دانه‌ها و کاهش کیفیت غذایی آنها می‌شود (Caswell, 1980, 1981; Boateng & Kusi, 2008). بر اساس گزارش Singh (1986) در نیجریه حدود ۴ درصد از کل تولید سالانه لوبیا چشم بلبلی که دارای ارزشی معادل ۳۰ میلیون دلار است در اثر خسارت این آفت از بین می‌رود (Singh, 1986; Ofuya & Osadahun, 2005). در ایران خسارت سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات روی لوبیا چشم بلبلی به قدری شدید است که اغلب کشاورزان ایرانی از کشت این محصول روی گردان می‌شوند (Behdad, 2002). به منظور حفاظت حبوبات انبار شده از آلودگی به سوسک چهار نقطه‌ای، از حشره‌کش‌های مختلف مصنوعی و بویژه تدخین شونده‌ها استفاده می‌شود. کاربرد بی‌رویه و مداوم این آفت‌کش‌ها سبب بوجود آمدن مشکلات جدی نظیر بروز مقاومت در آفات، اثرات سوء زیست محیطی و بجا ماندن بقایای سمی در محصولات غذایی شده است (Rahman & Talukder, 2006; Mahfuz & Khalequzaman, 2007; Moharrampour *et al.*, 2009). لذا با توجه به خسارت بالای آفات انباری و هزینه‌های بالای بکارگیری سموم شیمیایی و به منظور اجتناب از اثرات سوء زیست‌محیطی تدخین شونده‌های

1 . Apiaceae
2 . Lamiaceae

بازداری^۳ (RI)، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه این طیف‌ها با ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه GC-MS صورت گرفت. درصد نسبی هر کدام از ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی آنها در کروماتوگرام GC به روش نرمال کردن سطح^۴ بدست آمد.

کلنی اولیه سوسک نقطه‌ای حبوبات *C. maculatus* از آزمایشگاه حشره‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. به منظور تکثیر حشرات تعداد ۵۰ حشره نر و ماده روی ۱۰۰ گرم لوبیا چشم بلبلی منتقل شد. پس از یک روز حشرات کامل از ظروف پرورش حذف شد و بذور لوبیا حاوی تخم تا زمان خروج حشرات کامل نسل جدید در دستگاه انکوباتور در شرایط دمای $28 \pm 2^\circ\text{C}$ و رطوبت نسبی $60 \pm 5\%$ و در تاریکی نگهداری شدند. برای انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی از حشرات کامل یک روزه استفاده شد. آزمایش‌ها برای هر یک از جنس‌های نر و ماده به طور جداگانه انجام شد.

آزمایش زیست‌سنجی سمیت تنفسی بر اساس روش Rahman & Schmidt (1999) در ظروف شیشه‌ای به حجم ۲۷ میلی‌لیتر انجام شد. مشابه این روش در مطالعات محققان داخلی نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Shakarami *et al.*, 2004; Negahban *et al.*, 2010; Moravverj *et al.*, 2007). به منظور یافتن غلظت‌های مناسب، چند سری آزمایش مقدماتی انجام گرفت. شش غلظت با فاصله لگاریتمی مساوی در مقادیر ۱۴/۸۱-۲۹/۶۳ و ۱۹/۲۶-۴۲/۲۲ میکرولیتر بر لیتر هوا از اسانس رازیانه، مقادیر ۳۸/۵۲-۸۰ و ۶۲/۵۹-۱۱۴/۸۱ میکرولیتر بر لیتر هوا از اسانس کلپوره و مقادیر ۱۹/۴۵-۱۲۲/۲۲ و ۸۵/۱۹-۲۲۲/۲۲ میکرولیتر بر لیتر از اسانس مرزه به ترتیب روی حشرات نر و ماده بدون استفاده از حلال مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر لازم از هر اسانس به وسیله میکروسامپلر^۵ روی قطعات کاغذ صافی به قطر ۲ سانتی متر ریخته شد و کاغذ صافی‌ها داخل درپوش ظروف شیشه‌ای قرار داده شد. تعداد ۱۰ حشره کامل نر و ماده یک روزه به طور مجزا به داخل هر

مرزه *Satureja hortensis* L. از خانواده نعناعیان روی سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در اواخر فصل تابستان ۱۳۸۷ اندام‌های هوایی گیاه مرزه از مزرعه نمونه دانشگاه فردوسی مشهد جمع‌آوری شد و در محل تاریک و خشک به مدت یک هفته قرار گرفت تا خشک شود. اندام‌های هوایی دیگر گیاهان موجود در این مطالعه (شامل بذر رازیانه، گل و جوانه کلپوره) به صورت آماده و خشک شده از بازار محلی مشهد خریداری شد. تایید نام علمی مرزه توسط پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد و تایید اسامی علمی و خلوص سایر گیاهان در تحقیق حاضر با ارسال نمونه‌های خریداری شده به بخش گیاهان دارویی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی انجام گرفت. جهت تهیه اسانس، اندام‌های هوایی ذکر شده به شکل پودر درآمدند. در هر نوبت، ۵۰ گرم پودر گیاهی همراه با ۶۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه اسانس‌گیر شیشه‌ای مدل کلونجر^۱ (ساخت صنایع Labor Műszeripari Művek، مجارستان) طی مدت ۴ ساعت در دمای 100°C به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شد. اسانس‌های جمع‌آوری شده بوسیله سولفات سدیم (بدون آب) آگیری و تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای تیره به حجم ۲۰ میلی‌لیتر در یخچال (دمای 4°C) نگهداری شد.

جهت شناسایی اجزاء متشکله اسانس‌های گیاهی، از دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی^۲ شرکت Thermoquest-finnigan مدل Trace مجهز به ستون موئینه DB-5 به طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر، گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. برنامه با دمای بین ۶۰-۲۵۰ درجه سلسیوس و با سرعت $4^\circ\text{C}/\text{min}$ انجام شد. دمای محوطه تزریق روی 250°C تنظیم شد. شناسایی ترکیبات با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان و شاخص

3. Retention index
4. Area normalization method
5. Microsampler

1. Clevenger
2. Gas Chromatography-Mass Spectrometry

در اثر اسانس رازیانه و مرزه ($X^2=2.19$, $df=1$, $P=0.128$) اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. در حالی که شیب معادله پروبیت مرگ‌ومیر برای افراد نر در اثر اسانس کلپوره به طور معنی‌داری بزرگتر از اسانس مرزه بود ($X^2=3.87$, $df=1$, $P=0.049$). مقایسه مشابه برای افراد ماده نشان داد که شیب معادله پروبیت مرگ‌ومیر در اثر اسانس مرزه ($5/69$) به طور معنی‌داری کوچکتر از شیب نظیر در اثر اسانس رازیانه ($7/58$) بود ($X^2=4.03$, $df=1$, $P=0.045$) و اسانس کلپوره ($9/43$) و لی بین شیب پروبیت در اثر دو اسانس اخیر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($X^2=2.51$, $df=1$, $P=0.114$). در اسانس رازیانه بین شیب‌های خطوط پروبیت مرگ‌ومیر افراد نر و ماده اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($X^2=0.24$, $df=1$, $P=0.627$). نتایج مشابهی در مورد مقایسه بین شیب معادله پروبیت مرگ‌ومیر افراد نر و ماده در اثر اسانس کلپوره ($X^2=2.46$, $df=1$, $P=0.0116$) و اسانس مرزه ($X^2=0.001$, $df=1$, $P=0.97$) نیز بدست آمد. نتایج آنالیز پروبیت نشان داد که در همه موارد فاکتور g از 0.5 کوچکتر و مقدار آزمون t بزرگتر از $1/96$ بود. فاکتور هتروژنیته در تمامی موارد جز در زیست‌سنجی اسانس رازیانه علیه حشرات ماده ($1/49$) کمتر از 1 بدست آمد. فاکتور هتروژنیته بزرگتر از 1 ، نشان‌دهنده اعمال فاکتور g ($0/95$) در تصحیح مقدار LC_{50} می‌باشد. شاخص‌های LC_{50} و LC_{90} نشان دادند که اسانس رازیانه در مقایسه با اسانس کلپوره و مرزه دارای سمیت تنفسی بالاتری علیه حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات بود. کمترین میزان سمیت مربوط به اسانس مرزه علیه حشرات کامل ماده با LC_{50} معادل $156/66$ میکرولیتر بر لیتر هوا و بیشترین میزان سمیت مربوط به اسانس رازیانه علیه حشرات نر با LC_{50} معادل $21/31$ میکرولیتر بر لیتر هوا بود (جدول ۳).

مقایسه بین حساسیت حشرات نر و ماده نسبت به هر یک از اسانس‌ها با استفاده از نسبت LC_{50} و حدود اطمینان ۹۵ درصد آنها نشان داد که میزان LC_{50} هر یک از اسانس‌های رازیانه، مرزه و کلپوره برای حشرات ماده به طور معنی‌داری بزرگتر از میزان این شاخص علیه حشرات نر بود (جدول ۴). مقایسه سمیت اسانس‌ها

ظرف منتقل شد. به منظور جلوگیری از تماس حشرات با کاغذ صافی و حذف اثر سمیت تماسی اسانس‌ها، روی دهانه شیشه با توری پوشانده و سپس درپوش آن محکم بسته شد. برای اطمینان بیشتر از عدم نشتی ترکیبات فرار، اطراف درپوش به وسیله میکروفیلیم پوشیده شد. تعداد حشرات مرده در ظروف تیمار و شاهد ۲۴ ساعت بعد از اسانس‌دهی شمارش و ثبت شد. آنالیز رگرسیون پروبیت مرگ‌ومیر-غلظت توسط نرم افزار POLO-PC و مقایسه سمیت اسانس‌ها به روش Robertson & Preisler (1992) صورت گرفت.

نتایج

نتایج آنالیز شیمیایی اسانس‌ها نشان داد که مونوترپن‌ها بخش اصلی ترکیبات اسانس‌های رازیانه، کلپوره و مرزه را تشکیل می‌دهند. اصلی‌ترین ترکیبات در اسانس رازیانه، ترانس-انتول ($60/61\%$)، فنچون ($12/14\%$)، لیمونن ($7/92\%$) و پارا-آلیل انیزول ($5/47\%$)، در اسانس کلپوره، پیپریتون اکساید ($21/72\%$)، آلفا-پینن ($11/33\%$)، کارون ($11/29\%$)، اسپاتولنول ($6/33\%$) و لیمونن ($5/03\%$) و در اسانس مرزه، کارواکرول ($50/13\%$)، تیمول ($26/77\%$)، گاما-ترپینن ($4/68\%$) و پارا-سیمن ($4/31\%$) بودند (جدول ۱). نتایج حاصل از زیست‌سنجی نشان داد که در هر سه اسانس مورد مطالعه با افزایش غلظت اسانس، مرگ‌ومیر حشرات کامل در هر دو جنس نر و ماده افزایش یافت (جدول ۲). جهت مقایسه اثر سمیت تنفسی اسانس‌های مورد مطالعه، آنالیز پروبیت روی داده‌های مرگ‌ومیر حاصل پس از ۲۴ ساعت اسانس‌دهی صورت گرفت. مقادیر شیب خطوط پروبیت مرگ‌ومیر برای افراد نر و ماده بین $5/73$ تا $9/43$ متغیر بود. مقایسه شیب خطوط بر اساس آزمون فرضیه موازی بودن خطوط نشان داد که شیب خطوط پروبیت برای افراد نر و ماده در سه اسانس مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند ($X^2=17.27$, $df=5$, $P=0.004$). مقایسه جفتی شیب‌های خطوط پروبیت افراد نر یا ماده بین اسانس‌ها نشان داد که برای افراد نر شیب معادله پروبیت مرگ‌ومیر در اثر اسانس رازیانه ($7/09$) و اسانس کلپوره ($7/55$) ($X^2=0.22$, $df=1$, $P=0.636$) و همچنین شیب پروبیت

جدول ۲- درصد مرگ‌ومیر حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای حیوبات *C. maculatus* (خطای معیار± میانگین) در اثر سمیت تنفسی اسانس‌های رازیانه، کلپوره و مرزه در غلظت‌های مختلف پس از ۲۴ ساعت

خطای معیار± میانگین	غلظت اسانس (μL.L ⁻¹)	منبع اسانس	جنس حشره
۱۱/۶۷±۱/۶۷	۱۴/۸۱	رازیانه <i>Foeniculum vulgare</i>	نر
۲۳/۳۳±۲/۱۱	۱۶/۶۷		
۳۸/۳۳±۱/۶۷	۱۸/۵۲		
۵۵/۰۰±۲/۲۴	۲۳/۳۳		
۶۷/۷۱±۳/۰۷	۲۶/۳۰		
۸۸/۳۳±۱/۶۷	۲۹/۶۳		ماده
۱۰/۰۰±۰/۰۰	۱۹/۲۶		
۲۰/۰۰±۰/۰۰	۲۱/۸۵		
۳۸/۳۳±۳/۰۷	۲۸/۵۲		
۵۶/۶۷±۲/۱۱	۳۲/۵۹		
۷۶/۶۷±۲/۱۱	۳۷/۰۴	کلپوره <i>Teucrium polium</i>	نر
۹۵/۰۰±۲/۲۴	۴۲/۲۲		
۸/۳۳±۱/۶۷	۳۸/۵۲		
۲۶/۶۷±۳/۳۳	۴۴/۸۱		
۵۰/۰۰±۲/۵۸	۵۱/۴۸		
۶۱/۶۷±۳/۰۷	۵۹/۶۳		ماده
۷۳/۳۷±۳/۳۳	۶۹/۲۶		
۹۰/۰۰±۳/۶۵	۸۰/۰۰		
۱۰/۰۰±۲/۵۸	۶۲/۵۹		
۳۰/۰۰±۲/۵۸	۷۰/۷۴		
۵۶/۶۷±۲/۱۱	۸۰/۰۰	مرزه <i>Satureja hortensis</i>	نر
۷۰/۰۰±۲/۵۸	۹۰/۰۰		
۷۸/۳۳±۱/۶۷	۱۰۱/۸۵		
۹۱/۶۷±۳/۰۷	۱۱۴/۸۱		
۱۰/۰۰±۲/۵۸	۴۵/۱۹		
۲۵/۰۰±۴/۲۸	۵۵/۱۹		ماده
۴۰/۰۰±۲/۵۸	۶۷/۰۴		
۵۸/۳۳±۳/۰۷	۸۱/۴۸		
۷۳/۳۳±۲/۱۱	۱۰۰/۰۰		
۹۱/۶۷±۳/۰۷	۱۲۲/۲۲		
۸/۳۳±۱/۶۷	۸۵/۱۹	مرزه <i>Satureja hortensis</i>	ماده
۲۰/۰۰±۲/۵۸	۱۱۸/۵۲		
۴۰/۰۰±۲/۵۸	۱۳۷/۰۴		
۵۳/۳۳±۲/۱۱	۱۶۲/۹۶		
۶۵/۰۰±۲/۲۴	۱۸۸/۸۹		
۸۳/۳۳±۲/۱۱	۲۲۲/۲۲		

*: Retention time

بر اساس شاخص LC₅₀ نشان داد که برای هر یک از حشرات نر یا ماده، LC₅₀ اسانس مرزه به طور معنی‌داری بزرگتر از LC₅₀ اسانس‌های رازیانه و کلپوره بود. همچنین شاخص‌های LC₅₀ اسانس کلپوره علیه هر یک از حشرات نر و ماده به طور معنی‌داری بزرگتر از میزان این شاخص‌ها در اسانس رازیانه بودند (جدول ۵).

جدول ۱- زمان بازداری و میزان ترکیبات اصلی اسانس گیاهان رازیانه *Foeniculum vulgare*، کلپوره *Teucrium polium* و مرزه *Satureja hortensis* جمع‌آوری شده در سال ۱۳۸۷ از مشهد

Composition (%)	RT*	Compounds	منبع اسانس	
۲/۳۲	۱۰/۳۹	Alpha-pinene	رازیانه <i>Foeniculum vulgare</i>	
۲/۰۹	۱۱/۵۵	Beta-pinene		
۲/۱۲	۱۲/۳	P-cymene		
۸/۹۲	۱۲/۹۲	Limonene		
۱۲/۱۴	۱۴/۷۴	Fenchone		
۵/۴۷	۱۷/۷۲	P-allyl anisole		
۶۰/۶۱	۲۰/۵۱	trans-anethol		
۶/۳۳	Other		
۱۱/۳۳	۱۰/۴۲	Alpha-pinene		کلپوره <i>Teucrium polium</i>
۵/۷۷	۱۱/۵۷	Beta-pinene		
۴/۳۴	۱۱/۶۸	Myrcene		
۵/۰۳	۱۲/۹	Limonene		
۲/۲۹	۱۶/۸۳	Cis-verbenol		
۱۱/۲۹	۱۹/۰۳	Carvone		
۱/۵۸	۱۹/۳۶	Trans-piperitenone oxide		
۲۱/۷۲	۲۲/۵۵	Piperitenone oxide		
۲/۷۲	۲۴/۱۹	Beta-caryophyllene		
۳/۲	۲۵/۷۲	Germacrene D		
۶/۲۳	۲۸/۱۷	Spathulenol	مرزه <i>Satureja hortensis</i>	
۳/۴	۲۸/۳۳	Caryophyllene oxide		
۴/۲۸	۲۹/۹۱	Beta-eudesmol		
۱۶/۸۲	Other		
۱/۰۱	۱۰/۱۴	Alpha-thujene		
۱/۳۳	۱۰/۳۹	Alpha-pinene		
۱/۸۲	۱۱/۶۸	Myrcene		
۴/۶۸	۱۲/۵۶	Gamma-terpinene		
۴/۳۱	۱۲/۷۶	P-cymene		
۲۷/۷۷	۱۳/۸۳	Thymol		
۵۰/۱۳	۲۰/۷۱	Carvacrol		
۲/۲۱	۱۸/۹۲	Carvacrol methyl ether		
۶/۷۴	Other		

جدول ۳- آنالیز پروبیت روابط مرگومیر- غلظت پس از ۲۴ ساعت ناشی از سمیت تنفسی اسانس‌های رازیانه، کلپوره و مرزه روی حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای *C. maculatus* به تفکیک جنس

منبع اسانس	جنس حشره	n	(خطای معیار ±) شیب %	χ^2 (df=4)	نسبت t	هتروژنیته (۰/۹۵)	فاکتور g	غلظت کشنده ($\mu\text{L.L}^{-1}$) (حدود اطمینان ۹۵ درصد)	
								LC ₉₀	LC ₅₀
رازیانه <i>F. vulgare</i>	نر	۴۲۰	۷/۰۹(±۰/۷۲) ^{AB}	۲/۵۹	۹/۸۱	۰/۶۵	۰/۰۳۹	۲۱/۳۱	۳۲/۲۹
	ماده	۴۲۰	۷/۵۸(±۰/۷۱) ^a	۵/۹۷	۱۰/۷۰	۱/۴۹	۰/۱۰	۲۹/۴۵	۲۹/۷۷-۳۶/۳۷
									۴۳/۴۷
کلپوره <i>T. polium</i>	نر	۴۲۰	۷/۵۵(±۰/۷۶) ^A	۳/۱۴	۹/۹۸	۰/۷۹	۰/۰۳۸	۵۴/۶۳	۳۸/۷۲-۵۳/۱۸
	ماده	۴۲۰	۹/۴۳(±۰/۹۳) ^a	۳/۹۱	۱۰/۱۳	۰/۹۸	۰/۰۳۷	۸۰/۷۵	۷۴/۹۷-۸۹/۶۶
									۱۱۰/۴۳
مرزه <i>S. hortensis</i>	نر	۴۲۰	۵/۷۳(±۰/۵۶) ^B	۱/۰۲	۱۰/۱۷	۰/۲۶	۰/۰۳۷	۷۰/۰۶-۷۸/۹۶	۱۱۲/۵۹-۱۴۳/۰۴
	ماده	۴۲۰	۵/۶۹(±۰/۶۲) ^b	۱/۶۸	۹/۲۱	۰/۴۲	۰/۰۴۵	۱۵۶/۶۶	۲۶۳/۹۱
									۲۳۵/۵۸-۳۰۹/۰۶

n: تعداد حشرات مورد آزمایش

±: شیب خطوط با حروف مشابه (بزرگ: افراد نر، کوچک: افراد ماده) در ستون با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (آزمون فرضیه موازی بودن خطوط، P<0.05)

جدول ۴- نسبت‌های LC₅₀ و حدود اطمینان ۹۵٪ آنها جهت مقایسه بین حساسیت حشرات نر و ماده سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات *C. maculatus* در اثر سمیت تنفسی اسانس‌ها

متغیر	نسبت LC ₅₀	حدود اطمینان ۹۵ درصد
منبع اسانس	(LC ₅₀ نر : LC ₅₀ ماده)	مقایسه بین حساسیت حشرات ماده و نر نسبت به هر اسانس
رازیانه	۱/۳۸	۱/۲۹-۱/۴۸*
کلپوره	۱/۴۸	۱/۳۹-۱/۵۷*
مرزه	۲/۱۱	۱/۹۴-۲/۲۹*

±: حدود اطمینان ۹۵٪ بر اساس روش روبرتسون و پریسلر (۱۹۹۲) محاسبه شد.
*: اختلاف معنی‌داری بین LC₅₀ های مقایسه شده در سطح ۵٪ وجود دارد.

جدول ۵- نسبت‌های LC₅₀ و حدود اطمینان ۹۵٪ آنها جهت مقایسه سمیت اسانس‌ها روی سوسک چهار نقطه‌ای حیوانات *C. maculatus* به تفکیک جنس

متغیر	نسبت LC ₅₀	حدود اطمینان ۹۵ درصد
جنس حشره	(LC ₅₀ رازیانه : LC ₅₀ مرزه)	مقایسه بین سمیت اسانس‌ها روی هر جنس
نر	۳/۴۹	۳/۲۳-۳/۷۷*
ماده	۵/۳۲	۴/۹۳-۵/۷۳*
جنس حشره	(LC ₅₀ کلپوره : LC ₅₀ مرزه)	مقایسه بین سمیت اسانس‌ها روی هر جنس
نر	۱/۳۶	۱/۲۶-۱/۴۷*
ماده	۱/۹۴	۱/۸۱-۲/۰۸*
جنس حشره	(LC ₅₀ رازیانه : LC ₅₀ کلپوره)	مقایسه بین سمیت اسانس‌ها روی هر جنس
نر	۲/۵۶	۲/۴۰-۲/۷۴*
ماده	۲/۷۴	۲/۵۸-۲/۹۱*

±: حدود اطمینان ۹۵٪ بر اساس روش روبرتسون و پریسلر (۱۹۹۲) محاسبه شد.
*: اختلاف معنی‌داری بین LC₅₀ های مقایسه شده در سطح ۵٪ وجود دارد.

بحث

میزان LC_{50} اسانس مرزه بیش از $3/5$ برابر LC_{50} در اسانس رازیانه و بیش از $1/5$ برابر میزان این شاخص در اسانس کلپوره بود (جدول ۷). سمیت تنفسی متفاوت اسانس‌های مختلف روی یک گونه حشره در مطالعات سایر دانشمندان نیز نشان داده شده است (Keita *et al.*, 2001; Aslan *et al.*, 2004; Manzoomi *et al.*, 2010). سمیت تنفسی اسانس رازیانه و مرزه روی برخی آفات از جمله شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* Herbst و عسلک پنبه *Bemisia tabaci* Genn. در منابع علمی بررسی شده است (Kim & Ahn, 2001; Aslan *et al.*, 2006; Chaubey, 2004; Chaubey, 2006). LC_{50} تنفسی اسانس رازیانه در مدت ۲۴ ساعت علیه شپشه قرمز آرد را برابر $18/55$ میکرولیتر بر لیتر هوا گزارش کرد. در تحقیقات (Aslan *et al.*, 2004)، مقدار LC_{50} تنفسی اسانس مرزه روی حشرات کامل عسلک پنبه معادل $0/44$ میکرو لیتر بر لیتر هوا گزارش گردید که بسیار کمتر از LC_{50} اسانس مذکور روی سوسک چهارنقطه‌ای حبوبات در تحقیق حاضر می‌باشد. علت این تفاوت می‌تواند ناشی از حساسیت بیشتر عسلک پنبه در مقایسه با سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات نسبت به اسانس مرزه باشد. علاوه بر تفاوت در گونه حشره مورد بررسی، اجزاء متشکله اسانس‌های استخراج شده از جمعیت‌های یک گونه گیاهی مشخص در مناطق رویش و فصول مختلف ممکن است از نظر کیفی و کمی با یکدیگر اختلاف داشته باشند که در نتیجه اثرات بیولوژیکی مختلفی روی حشرات خواهند گذاشت (Isman *et al.*, 2007; Ngamo *et al.*, 2007).

مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که اسانس‌های گیاهی به خاطر اجزای سازنده‌شان که عمدتاً مونوترپن‌ها می‌باشند، سمیت قابل توجهی روی بسیاری از آفات انباری دارند. در حقیقت مونوترپن‌ها ترکیبات بسیار فراری هستند که برای کنترل آفات به روش تدخینی مناسب می‌باشند (Lee *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2005). در آنالیز شیمیایی اسانس‌های مورد بررسی در مطالعه اخیر با استفاده از دستگاه کروماتوگراف مشخص شد که اصلی‌ترین ترکیبات در اسانس رازیانه ترانس-انتول، فنچون و لیمونن، در اسانس کلپوره پیپریتون اکساید، آلفا پینن و کارون و در اسانس مرزه کارواکرول،

نتایج بررسی سمیت تنفسی اسانس‌های رازیانه، کلپوره و مرزه روی حشرات کامل یک روزه سوسک چهار نقطه‌ای نشان داد که میزان تلفات حشرات کامل با افزایش غلظت اسانس، افزایش یافت. وجود روابط مثبت بین درصد تلفات و غلظت اسانس‌ها به وسیله آنالیز پروبیت نیز تایید گردید (جدول ۲). اثر غلظت اسانس در سمیت تنفسی در تحقیقات مختلف نیز نشان داده شده است. از جمله سمیت تنفسی اسانس گلپر *Heracleum persicum* Desf. اسطوخودوس *Lavandula officinalis* L. ترخون *Artemisia dracunculus* L. کاکوتی کوهی *Ziziphora clinopodioides* Boiss. روی حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای با افزایش غلظت اسانس، افزایش یافت (Lolestani & Shayesteh, 2009; Manzoomi *et al.*, 2010). مقایسه حساسیت حشرات نر و ماده با استفاده از نسبت‌های LC_{50} نشان داد که حشرات ماده نسبت به سمیت تنفسی هر سه اسانس مورد بررسی به طور معنی‌داری در مقایسه با حشرات نر مقاوم تر بودند (جدول ۴). حساسیت بیشتر افراد نر سوسک‌های بوروخیده در مقایسه با افراد ماده، نسبت به سمیت تنفسی اسانس‌های گیاهی در تحقیقات مختلف نشان داده شده است (Papachristos & Stamopoulos, 2002; Papachristos *et al.*, 2004). بر اساس گزارش (Papachristos & Stamopoulos, 2002) افراد ماده سوسک لوبیا *Acanthoscelides obtectus* Say مقایسه با افراد نر مقاومت بیشتری به سمیت تنفسی اسانس‌های رزماری *Rosmarinus officinalis* L. نعناع سبز *Mentha viridis* L. و پرتقال *Citrus sinensis* Osbeck نشان دادند. دلایل احتمالی تفاوت حساسیت حشرات نر و ماده به اسانس ممکن است ناشی از تفاوت حشرات نر و ماده از نظر اندازه یا وزن، میزان چربی بدن و نیز تفاوت در روش سم زدایی اسانس در هر یک از جنس‌ها باشد (Weaver *et al.*, 1991; Weaver *et al.*, 2002; Papachristos & Stamopoulos, 2002; Papachristos *et al.*, 2004).

نتایج بررسی حاضر نشان داد که اسانس رازیانه و مرزه به ترتیب بیشترین و کمترین سمیت را علیه حشرات کامل سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات داشتند.

اسانس مرزه را تشکیل داد. نتایج تحقیقات Lee et al. (2001) در مورد سمیت کارواکرول روی شپشه برنج تقریباً مشابه مقدار LC₅₀ بدست آمده برای اسانس مرزه علیه افراد نر سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات (۷۴/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا) در بررسی حاضر می‌باشد. بنابراین با استناد به اثرات حشره‌کشی مونوترپن‌ها و سایر متابولیت‌های ثانویه موجود در اسانس رازیانه، مرزه و کلپوره می‌توان سمیت تنفسی اسانس‌های مذکور روی سوسک چهار نقطه‌ای در بررسی حاضر را توجیه کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی حاکی از سمیت تنفسی قابل توجه اسانس‌های رازیانه، کلپوره و مرزه روی سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات و پتانسیل کاربردی آنها در حفاظت از حبوبات علیه سوسک چهار نقطه‌ای می‌باشد. معذالک استفاده کاربردی این اسانس‌ها به عنوان حفاظت‌کننده‌های انباری مستلزم انجام تحقیقات گسترده در زمینه استاندارد سازی اسانس‌ها، شناسایی و جداسازی ترکیبات فعال و دستیابی به روش‌های فرمولاسیون مناسب و مقرون به صرفه جهت کاربرد آنها در محیط انبار می‌باشد.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد. از معاونت محترم پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر پشتیبانی مالی، از راهنمایی‌های ارزنده آقای دکتر حسینی استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده در طی مراحل این پژوهش، و همچنین از همکاری صمیمانه آقای مهندس صادقی کارشناس گروه زراعت و اصلاح نباتات در تهیه اسانس گیاهان تشکر و قدردانی می‌گردد.

تیمول، گاما ترپینن و پارا-سیمن بودند (جدول ۱). اثرات بیولوژیکی متنوع برخی از این ترکیبات روی حشرات توسط محققین مختلف مورد بررسی و تایید قرار گرفته است (Kim & Ahn, 2001; Lee et al., 2001; Lee et al., 2003; Moravvej & Abbar, 2008). بر اساس تحقیقات Kim & Ahn (2001) ترکیبات ترانس-انتول، فنچون و استراگول^۱ موجود در اسانس رازیانه سمیت تنفسی قابل توجهی علیه سوسک چهار نقطه‌ای حبوبات و شپشه برنج *Sitophilus oryzae* L. داشتند. این ترکیبات در غلظت ۰/۴۲ میلی گرم بر سانتی متر مربع (معادل ۴۹/۹۸ میکرولیتر بر لیتر هوا) پس از ۴۸ ساعت اسانس‌دهی، ۱۰۰ درصد تلفات روی حشرات کامل هر دو گونه آفت مذکور ایجاد کردند. سمیت تنفسی ترکیبات خالص تیمول، کارواکرول، آلفا-پینن، گاما-ترپینن، کارون و لیمونن که از ترکیبات اسانس‌های مرزه و کلپوره نیز محسوب می‌شوند، روی چندین گونه آفت انباری نظیر شپشه قرمز آرد، شپشه برنج، شپشه دنداندار غلات *Oryzaphilus surinamensis* L. بررسی گردید (Lee et al., 2001, 2003, 2004). بر اساس گزارش Lee et al. (2001) مونوترپن‌های پارا-سیمن، آلفا-پینن، لیمونن، کارواکرول و تیمول سمیت قابل توجهی روی حشرات کامل شپشه برنج داشتند. نامبردگان مقادیر LC₅₀ ترکیبات فوق الذکر علیه شپشه برنج را به ترتیب برابر با ۲۵، ۵۴/۹، ۶۱/۵، ۷۹/۷ و ۶۹/۷ میکرولیتر بر لیتر هوا برآورد کردند. بر طبق نتایج Najafi et al. (2010) حدود ۶۰-۵۵ درصد از اسانس مرزه حاوی کارواکرول می‌باشد. در مطالعه حاضر نیز کارواکرول ۵۰/۱۳ درصد از حجم

1. Estragole

REFERENCES

- Aslan, I., Ozbek, H., Calmasur, O. & Sahin, F. (2004). Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch. and *Bemisia tabaci* Genn. *Industrial Crops and Products*, 19, 167-173.
- Behdad, E. (2002). *Introductory Entomology and Important Plant Pests in Iran* (1th ed.). Yad Bood Publishing, Isfahan. (In Farsi)
- Boateng, B. A. & Kusi, F. (2008). Toxicity of jatropha seed oil to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid, *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Applied Sciences Research*, 4 (8), 945-951.
- Caswell, G. H. (1980). A review of the work done in the entomology section of Institute for Agricultural Research. (ed.), Samaru Miscellan Paper (Nigeria). (pp. 12).

5. Caswell, G. H. (1981). Damage of stored cowpeas in the northern part of Nigeria. *Journal of Agricultural Research*, 1, 154-158.
6. Chaubey, M. K. (2006). Toxicity of essential oils from *Cuminum cyminum* (Umbelliferae), *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Foeniculum vulgare* (Umbelliferae) against stored-product beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 34, 1719-1727.
7. Chaubey, M. K. (2007). Insecticidal activity of *Trachyspermum ammi* (Umbelliferae), *Anethum graveolens* (Umbelliferae) and *Nigella sativa* (Ranunculaceae) essential oils against stored-product beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *African Journal of Agricultural Research*, 2 (11), 596-600.
8. Chaubey, M. K. (2008). Fumigant toxicity of essential oils from some common spices against pluse beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Oleo Science*, 57 (3), 171-179.
9. Garcia, M., Donadel, O. J., Ardanaz, C. E., Tonn, C. E. and Sosa, M. E. (2005). Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science*, 61, 612-618.
10. Golestani-Kalat, Z. (2009). The biological effects of *Zataria multiflora* Boiss. and *Lavandula angustifolia* Mill. essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). MSc. dissertation. Ferdowsi University, Mashhad, Iran. (In Farsi)
11. Ilboudo, Z., Dabire, L. C. B., Nebie, R. C. H., Dicko, I. O., Dugravot, S., Cortesero, A. M. & Sanon, A. (2010). Biological activity and persistence of four essential oils towards the main pest of stored cowpeas, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 46, 124-128.
12. Isman, M. B., Machial, C. M., Miresmailli, S. & Bainard, L. D. (2007). Essential oil-based pesticide: New insights from old chemistry. In H. Ohkawa, H. Miyagawa and P. W. Lee (Eds.), *Pesticide Chemistry, Crop protection, Public Health, Environmental Safety*. (pp. 201-209). Wiley-Vch Verlag GmbH & Co, Weinheim.
13. Kazemi, F., Talebi, A. A., Fathipour, Y. & Farahani, S. (2009). A comparative study on the effect of four leguminous species on biological and population growth parameters of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Col.: Bruchidae). *Advances in Environmental Biology*, 3(3), 226-232.
14. Keita, S. M., Vincent, C., Schmit, J. P., Arnason, J. T. & Belanger, A. (2001). Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 37, 339-349.
15. Kim, D. H. & Ahn, Y. J. (2001). Contact and fumigant activities of constituents of *Foeniculum vulgare* fruit against three coleopteran stored-product insects. *Pest Management Science*, 57, 301-306.
16. Kim, S. I., Park, C., Ohh, M. H., Cho, H. C. & Ahn, Y. J. (2003). Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae). *Journal of Stored Products Research*, 39, 11-19.
17. Lee, B. H., Annis, P. C., Tumaalii, F. & Choi, W. S. (2004). Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research*, 40 (5), 553-564.
18. Lee, B. H., Choi, W. S., Lee, S. E. & Park, B. S. (2001). Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Crop Protection*, 20, 317-320.
19. Lee, S., Peterson, C. J. & Coats, J. R. (2003). Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *Journal of Stored Products Research*, 39 (1), 77-85.
20. Lolestani, F. A. & Shayesteh, N. (2009). Fumigant toxicity of *Ziziphora clinopodioides* (Boiss.) (Lamiaceae) against adults and eggs of *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Biotechnology Science*, 9 (1), 92-95.
21. Mahfuz, I. & Khalequzzaman, M. (2007). Contact and fumigant toxicity of essential oils against *Callosobruchus maculatus*. *Rajshahi University Journal of Zoology*, 26, 63-66.
22. Manzoomi, N., Ganbalani, G. N., Dastjerdi, H. R. & Fathi, S. A. A. (2010). Fumigant toxicity of essential oils of *Lavandula officinalis*, *Artemisia dracuncululus* and *Heracleum persicum* on the adults of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Munis Entomology and Zoology*, 5 (1), 118-122.
23. Moharramipour, S., Taghizadeh, A., Meshkatsadat, M. H., Fathipour, Y. & Talebi, A. A. (2009). Repellent activity and persistence of essential oil extracted from *Prangos acaulis* to three stored-product beetles. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 3 (2), 202-204.
24. Moravvej, G. & Abbar, S. (2008). Fumigant toxicity of citrus oils against cowpea seed beetle *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(1), 48-54.

25. Moravvej, G., Of-Shahraki, Z., Azizi-Arani, M. & Yaghmai, F. (2009). Fumigant Toxicity of *Bunium persicum* Boiss. (Umbelliferae) and *Elletaria cardamomum* Maton. (Zingiberaceae) oils against *Tribolium castaneum* (Herbst.) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Plant Protection*, 23 (2), 96-105. (In Farsi)
26. Moreira, M. D., Picanco, M. C., Barbosa, L. C. A., Guedes, R. N. C., Campos, M. R. D., Silva, G. A. & Martins, J. C. (2007). Plant compounds insecticide activity against coleoptera pests of stored products. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 42 (7), 909-915.
27. Najafi, F., Khavari-Nejad, R. A. & Ali, M. S. (2010). The effects of salt stress on certain physiological parameters in summer savory (*Satureja hortensis* L.) plants. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 6 (1), 13-21.
28. Negahban, M., Moharrampour, S. & Sefidkon, F. (2007). Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 43, 123-128.
29. Ngamo, T. S. L., Ngatanko, I., Ngassoum, M. B., Mapongmestsem, P. M. & Hance, T. (2007). Persistence of insecticidal activities of crude essential oils of three aromatic plants towards four major stored product insect pests. *African Journal of Agricultural Research*, 2 (4), 173-177.
30. Nyaz-Ali, S. (2004). Research and Production Program of Irrigated Pulses and the Challenges. *Proceedings of the 1th National Congress of Pluses*, 20-21 Nov., University of Ferdowsi, Mashhad, Iran, p. 193. (In Farsi)
31. Ofuya, T. L. & Osadahun, J. M. (2005). Effect of three plant powders on behaviour, mortality and reproductive fitness of *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae). *Zoological Science*, 26 (6), 603-608.
32. Papachristos, D. P., Karamanoli, K. I., Stamopoulos, D. C. & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2004). The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Pest Management Science*, 60 (5), 514-520.
33. Papachristos, D. P. & Stamopoulos, D. C. (2002). Repellent, toxic and reproduction inhibitory effect of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 38 (2), 117-128.
34. Prakash, A. & Rao, J. (1997). *Botanical Pesticide in Agriculture*. CRC Press Inc, New York.
35. Rahman, A. & Talukder, A. (2006). Bioefficacy of some plant derivatives that protect grain against the pluse beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Science*, 6, 17-24.
36. Rahman, M. M. & Schmidt, G. H. (1999). Effect of *Acorus calamus* L. (Asteraceae) essential oil vapours from various organs on *Callosobruchus phaseoli* (Gyllenhal) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research*, 35 (3), 285-295.
37. Raja, N., Albert, S., Ignacimuthu, S. & Dorn, S. (2001). Effect of plant volatile oils in protecting stored cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walpers against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) infestation. *Journal of Stored Products Research*, 37, 127-132.
38. Robertson, J. L. & Preisler, H. K. (1992). *Pesticide Bioassays with Arthropods*. CRC Press, Florida.
39. Shakarami, J., Kamali, K. & Moharrampour, S. (2004). Fumigant toxicity and repellency of essential oil of *Salvia bracteata* on four species of stored pest. *Entomological Society of Iran*, 24 (2), 35-49. (In Farsi)
40. Singh, S. R. (1986). IITA's cowpea research program. *Tropical Grain Legume Bulletin*, 32, 10-24.
41. Singh, V. N. and Pandey, N. D. (2001). Growth and development of *Callosobruchus chinensis* Linn. on different varieties. *Indian Journal of Entomology*, 63 (2), 182-185.
42. Talukder, F. A. & Howse, P. E. (1994). Repellent, toxic and food protectant effect of the pithraj, *Aphanamixis polystachya* against *Callosobruchus chinensis* in storage. *Journal of Chemical Ecology*, 20 (4), 60-67.
43. Viglianco, A. I., Novo, R. J., Cragolini, C. I., Nassetta, M. & Cavallo, E. A. (2008). Antifeedant and repellent effects of extracts of three plant from Cordoba (Argentina) against *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Bioassay*, 3 (4), 1-6.
44. Weaver, K. D., Dunkel, V. F., Ntezurbanza, L., Jackson, L. L. & Stock, T. D. (1991). The efficacy of linalool, a major component of freshly-milled *Ocimum canum* Sims (Lamiaceae), for protection against postharvest damage by certain stored product Coleoptera. *Journal of Stored Products Research*, 27, 213-220.
45. Weaver, K. D., Wells, D. C., Dunkel, V. F., Bertsch, W., Sing, E. S. & Sriharan, S. (1994). Insecticidal activity of floral, foliar, and root extracts of *Tagetes minuta* (Asterales: Asteraceae) against adult Mexican bean weevils (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Economic Entomology*, 87, 1718-1725.