# اثر مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی تلخ‌بیان *Goebelia alopecuroides* L. و گاودانه *Vicia ervilia* L. بر فعالیت تریپسین و کیموتریپسین گوارشی کرم غوزه‌ی پنبه *Helicoverpa armigera* Hb.

داود محمدی[۱]، رضا فرشباف پورآباد[۲*]، محمدرضا رشیدی[۳] و سیدابوالقاسم محمدی[۴]

۱- استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان.
۲- استاد گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.
۳- استاد دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز.
۴- استاد گروه به نژادی و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.
*مسئول مکاتبه rfpourabad@yahoo.com

تاریخ دریافت:۹۴/۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۹

## چکیده

در گیاهان طی تکامل ترکیبات متعددی برای مقابله با گیاه‌خواران تولید شده‌است. اختلال در سیستم گوارشی حشرات با استفاده از مهارکننده‌های گیاهی آنزیم‌های گوارشی، یکی از روش‌های موثر مدیریت آفات به شمار می‌رود. در این مطالعه تاثیر عصاره‌ی تام و فراکسیون‌های مختلف بذر گیاهان تلخ‌بیان و گاودانه بر فعالیت پروتئولیتیک سیستم گوارشی کرم غوزه‌ی پنبه مورد بررسی قرار گرفت. عصاره‌ی تام تلخ‌بیان در مهار پروتئاز گوارشی کرم غوزه‌ی پنبه موثرتر از گاودانه بود. همچنین عصاره‌ی تام تلخ‌بیان، تریپسین و کیموتریپسین گاوی و گوارشی حشره مورد مطالعه را بیش از عصاره‌ی گاودانه مهارکرد. عصاره‌ی تام گاودانه در مهار کیموتریپسین موثرتر عمل کرد. فراکسیون (۸۰-۷۰ درصد) تلخ‌بیان بیشترین اثر مهارکنندگی را بر پروتئاز کرم غوزه‌ی پنبه و تریپسین گاوی داشت. فراکسیون اول گاودانه پروتئاز تام گوارشی را بیشتر از سایر فراکسیون‌ها مهار کرد. فراکسیون اول (۲۰- صفر درصد) عصاره‌ی بذر هر دو گیاه در مقایسه با سایر فراکسیون‌ها، تریپسین کرم غوزه‌ی پنبه را بیشتر مهار کرد. فراکسیون چهارم (۷۰-۶۰ درصد) تلخ‌بیان و سوم (۶۰-۴۰ درصد) گاودانه در مهار فعالیت کیموتریپسین کرم غوزه‌ی پنبه موثرتر از سایر فراکسیون‌ها عمل نمودند. مقایسه‌ی تاثیر عصاره‌ی تام گیاهان تلخ‌بیان و گاودانه بر پروتئاز تام گوارشی دو جمعیت مزرعه‌ای و آزمایشگاهی کرم غوزه‌ی پنبه نشان داد که با اختلاف غیرمعنی‌دار، جمعیت مزرعه‌ای بیش از جمعیت آزمایشگاهی تحت تاثیر قرار گرفت.

**واژه‌های کلیدی**: پروتئاز تام، تریپسین، تلخ‌بیان، گاودانه، کرم غوزه‌ی پنبه، کیموتریپسین.

## مقدمه

اندام‌های ذخیره‌ای اغلب گیاهان مانند غده‌ها، دانه‌ها و ساقه‌ها حاوی یک تا ۱۰ درصد (از کل پروتئین) مهارکننده هستند. سطح این مهارکننده‌ها به شرایط مختلف محیطی و رشدی بستگی دارد. آفات و بیماری‌ها موجب القای بروز این ترکیبات در گیاهان می‌شوند (دلئو و همکاران ۲۰۰۲). نقش‌های فیزیولوژیک متعدد مانند مهار پروتئازهای گیاهی، حفاظت در مقابل حمله‌ی گیاه‌خواران، پروتئین‌های ذخیره‌ای و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپوپتوزیس) به اثرات این مهارکننده‌ها نسبت داده شده است. این مهارکننده‌ها اغلب در اثر تنش وارده از طریق زخم‌های مکانیکی و یا تغذیه‌ی گیاه‌خواران ایجاد و یا افزایش پیدا می‌کنند. مسیرهای پیچیده بیوشیمیایی در نهایت موجب بیان ژن‌های رمزگذار این مهارکننده‌ها و تولید و تجمع آن‌ها در بخش‌های مختلف گیاهی می‌شوند (حبیب و فاضیل ۲۰۰۷).

دخالت مهارکننده‌ها سبب تشکیل ترکیب پایدار با پروتئازهای هدف، بلوکاژ، و تغییر یا جلوگیری از

دسترسی زیرنهشت آنزیم به جایگاه فعال آن می‌شود (دلئو و همکاران، ۲۰۰۲، حبیب و فاضیل ۲۰۰۷، پلگرینی و همکاران ۲۰۰۸). مهارکننده‌ها مشابه زیرنهشت طبیعی آنزیم عمل کرده و با اتصال به جایگاه فعال آن، مانع از فعالیت عادی آنزیم در جهت شکستن پیوندهای پپتیدی می‌شوند که در نتیجه، آنزیم مهار شده فعالیت بیوشیمیایی خود را از دست می‌دهد (لارنس و کاندال ۲۰۰۲). آنزیم‌های گوارشی تنها اهداف مهارکننده‌ها نیستند، بلکه تعادل آب، تعویض جلد و تنظیم آنزیم‌های حشرات نیز تحت تاثیر مهارکننده‌ها قرار می‌گیرند (حبیب و فاضیل ۲۰۰۷).

تریپسین (EC 3.4.21.4) یک ترکیب سرین پروتئازی می‌باشد که در سامانه گوارشی اغلب مهره‌داران فعال است. وزن مولکولی اغلب تریپسین‌های فعال در سامانه گوارشی حشرات ۳۵-۲۰ کیلودالتون و pH بهینه‌ی فعالیت آن‌ها ۱۰-۸ می‌باشد (ترا و فریرا ۲۰۰۵). تریپسین در همه‌ی حشرات به جز سن‌ها و برخی از سخت‌بالپوشان (Cucujiformia) فعال است. تریپسین به شکل غیرفعال به نام تریپسینوژن تولید می‌شود. این آنزیم پیوندهای پپتیدی را در انتهای کربوکسیلی اسیدهای آمینه لیسین و آرژینین جدا می‌کند و نقش بسیار موثری در گوارش پروتئین‌ها دارد. بر این اساس تمرکز اغلب مطالعات مهارکنندگی بالپولک‌داران بر مهارکننده‌های تریپسین بوده است (پیزولوسکا و پیزولوسکی ۲۰۰۰، بل و همکاران ۲۰۰۱، دلئو و همکاران ۲۰۰۱).

کیموتریپسین (EC 3.4.21.1) نیز در سیستم گوارشی اغلب حشرات فعال است و وزن مولکولی آن در حشرات بین ۳۰ تا ٤۰ کیلودالتون و pH بهینه‌ی فعالیت آن نیز ۱۰- ۸ می‌باشد. کیموتریپسین پلی‌پپتیدها را از بخش کربوکسیلی اسیدهای آمینه تیروزین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین می‌شکند. این آنزیم گوارشی به همراه تریپسین در اغلب مطالعات آنزیمی مربوط به حشرات و به‌ویژه بال‌پولک‌داران مورد توجه بوده است و تاثیر مهارکننده‌های گیاهی بر فعالیت آن به طور گسترده‌ای بررسی شده است (برادوی ۱۹۹۳، فرانکو و همکاران ۲۰۰۳، هره‌رو و همکاران ۲۰۰۵، تلنگ و همکاران ۲۰۰۹).

مطالعه و شناسایی گیاهان حاوی مهارکننده‌های آنزیمی گوارشی حشرات و مطالعات ویژگی‌های بیوشیمیایی آن‌ها اولین گام در راستای تولید ترکیبات مهارکننده آنزیم و یا انتقال ژن‌های رمزگذار آن‌ها به گیاهان و تولید گیاهان مقاوم می‌باشد.

محققین مطالعات متعددی در راستای بررسی اثرات مهارکنندگی عصاره‌های اندام‌های گیاهان مختلف انجام داده‌اند. به عنوان مثال کاندو و سین‌ها (۱۹۸۹) یک مهارکننده موثر روی آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین را از دانه‌های گیاه *Artocarpus integrifolia* L. خالص‌سازی کردند که به ترتیب ۸۰ و ۸۵ درصد تریپسین و کیموتریپسین را مهار کرد. سسیلیانی و همکاران (۱۹۹٤) یک مهارکننده سرین پروتئاز از دانه‌های کلزا جداسازی کردند. در بررسی دیگری دانه‌های گونه‌هایی از گیاهان تیره فاباسه[1] از نظر وجود مهارکننده‌های تریپسین مورد مطالعه قرار گرفتند. میزان مهارکنندگی ترکیبات استخراجی از گونه‌های مختلف تفاوت چشم‌گیری را نشان داد، به طوری که اثر مهارکنندگی خیلی کم در گونه *Lupinus* spp. و بیشترین میزان مهارکنندگی در *Glycine max* L. مشاهده گردید (گیلامون و همکاران ۲۰۰۸). برادوی (۱۹۹۳)، شش مهارکننده پروتئاز را از برگ‌های کلم، با اثر روی تریپسین و کیموتریپسین، جداسازی کرد. دامل و همکاران (۲۰۰۵) اثر مهارکننده پروتئاز خالص‌سازی شده از اندام‌های مختلف گوجه‌فرنگی را روی آنزیم تریپسین گاوی و پروتئاز گوارشی کرم غوزه‌ی پنبه مطالعه کردند. در این بررسی مشخص شد که مهارکننده در گل‌آذین در مقایسه با میوه‌ها و برگ‌ها

[1] Fabaceae

بیشتر تجمع کرده بود. در یک بررسی مشخص شد که مهارکننده‌های واریته‌های زراعی گیاه *Cajanus cajan* موجب مهار کامل آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین کرم غوزه‌ی پنبه شدند. با وجود این، واریته‌های وحشی، پروتئازهای این گونه را بیشتر مهار کردند (چوگل و همکاران، ۲۰۰۳). با توجه به پتانسیل بالای مهارکنندگی میزبان‌های وحشی و گیاهان غیر میزبان آفات و مقاومت‌هایی که حشرات نسبت به مهارکننده‌ها نشان داده‌اند، لزوم بررسی‌های بیشتر در جهت شناسایی مهارکننده‌های با کارایی بیشتر احساس می‌شود.

شب‌پره‌های خانواده‌ی Noctuidae جزو مهم‌ترین آفات خسارت‌زا به محصولات کشاورزی می‌باشند (متیوس، ۱۹۹۹). کرم غوزه‌ی پنبه *Helicoverpa armigera* Hübner با اهمیت و گسترش متفاوت از بیشتر نقاط جهان گزارش شده است (اسمیت و همکاران ۱۹۹۲). این آفت تقریبا از کلیه‌ی نواحی پنبه-خیز ایران شامل استان‌های تهران، اردبیل، آذربایجان غربی، خوزستان، فارس، گرگان، خراسان و مازندران گزارش شده است (بهداد ۱۳۷٦، اسماعیلی و همکاران ۱۳۸۱ و مصلی‌نژاد ۱۳۸۱). پنبه، نخود، لوبیا، بامیه، گوجه‌فرنگی، کنجد، توتون، کنف، ذرت و آفتابگردان از میزبان‌های عمده این آفت در ایران هستند (اسماعیلی و همکاران ۱۳۸۱، خانجانی ۱۳۸۵). خسارت عمده‌ی این آفت به ویژه روی بخش‌های گل‌ده، میوه‌ها و جوانه‌های انتهایی میزبان‌های خود می‌باشد (متیوس ۱۹۹۹). چندخواری بالا، دامنه‌ی وسیع گسترش جغرافیایی، تحرک، توانایی مهاجرت، دیاپوز اختیاری، باروری بالا و پتانسیل بروز مقاومت به آفت‌کش‌ها موجب شده است این حشره جزو مهم‌ترین آفات کشاورزی محسوب شود (فیت، ۱۹۸۹). با توجه به اهمیت کرم غوزه‌ی پنبه به عنوان یکی از آفات گیاهان زراعی و سبزی و صیفی، در راستای معرفی منابع گیاهی حاوی مهارکننده‌های آنزیمی، اثرات مهارکنندگی عصاره‌ی دو گیاه تلخ‌بیان *Goebelia alopecuroides* و گاودانه *Vicia ervilia* بر فعالیت پروتئازهای گوارشی آن مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش ها

### حشره

در تحقیق حاضر از کلنی کرم غوزه‌ی پنبه موجود در گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز استفاده شد. قبل از شروع آزمایش‌ها حشرات پنج نسل در شرایط آزمایشگاهی (دمای ۲±۲٦ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد و دوره‌ی نوری ۱٦ ساعت روشنایی) روی غذای مصنوعی بر پایه لوبیا چشم بلبلی پرورش یافتند. غذای مصنوعی با تغییراتی در روش شوری و هال (۱۹٦۵) تهیه شد.

### تشریح لاروها و استخراج آنزیم

برای استخراج آنزیم از روش تمهن و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد. لاروهای سن ششم ۲٤ ساعته، پس از بی‌حس شدن در سرما در داخل پتری‌های ۱۰ سانتی‌متری حاوی بافر استخراج ( Glycin-NaOH 200mM, pH 10) از پهلو شکافته شده و ابتدا و انتهای لوله گوارش بریده شد و تا حد امکان ذرات چربی به صورت دستی با استفاده از قلم مو و یا پنس جدا شد. نمونه‌ها پس از هموژن شدن (با استفاده از هموژنایزر مدل Ultra Turrax T8) به مدت دو ساعت در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس سانتریفیوژ شده (با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm) و محلول رونشین به عنوان منبع آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

### تهیه‌ی عصاره گیاهی

برای تهیه‌ی بذر در این تحقیق، از گیاهان تلخ‌بیان داخل محوطه دانشگاه تبریز استفاده شد و بذر گاودانه نیز از مدیریت جهاد کشاورزی شهرستان مشکین شهر تهیه گردید. برای تهیه‌ی عصاره‌ی تام بذور گیاهی از

روش تلنگ و همکاران (۲۰۰۳) استفاده شد. بذرها با استفاده از آسیاب برقی معمولی کاملا پودر شدند. سپس مقدار مشخصی از پودرها به ترتیب با هگزان و استون به منظور چربی‌زدایی و رنگ‌زدایی شستشو داده شدند. پودر بدست آمده پس از خشک شدن توزین و با شش برابر وزنی حجمی آب دوبار تقطیر به مدت چهار ساعت در حمام آب یخ هم زده شد. سپس محلول سطحی به داخل فالکن‌های ۱۰ میلی‌لیتری منتقل و به مدت نیم ساعت با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس سانتریفیوژ شد. محلول سطحی به عنوان عصاره‌ی تام مهار کننده مورد استفاده قرار گرفت. از عصاره‌ی تام بذر گیاهان در مرحله‌ی بعد برای تهیه فراکسیون‌های مختلف با ترسیب در نمک سولفات آمونیوم استفاده شد.

**نحوه‌ی تهیه‌ی فراکسیون‌های مختلف عصاره‌ی گیاهان با ترسیب در نمک سولفات آمونیوم**

به‌دلیل این‌که میزان حلالیت نمک سولفات آمونیوم در دماهای مختلف متفاوت می‌باشد، به صورت استاندارد از دمای چهار درجه‌ی سلسیوس استفاده شد. درجات مختلف نمک پس از تهیه، داخل آب یخ به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. محلول سطحی برای تهیه غلظت بعدی سولفات آمونیوم مورد استفاده قرار گرفت و پروتئین ته‌نشین شده به عنوان فراکسیون مربوطه جمع‌آوری و جهت بررسی قدرت مهارکنندگی در فریزر (۲۰- درجه‌ی سلسیوس) نگهداری شد. در این بررسی از پنج غلظت سولفات آمونیوم شامل، ۲۰-صفر، ۴۰-۲۰، ۶۰-۴۰، ۷۰-۶۰ و ۸۰-۷۰ درصد به‌ترتیب به صورت فراکسیون‌های اول تا پنجم استفاده شد.

**سنجش فعالیت پروتئاز تام، تریپسین و کیموتریپسین**

از زیرنهشت رنگزای آزوکازئین (Azocasein, Sigma) برای سنجش فعالیت پروتئاز تام با استفاده از روش تلنگ و همکاران (۲۰۰۳)، گیری و همکاران (۲۰۰۳) و تمهن و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد. از زیرنهشت‌های رنگزای BApNA (N-α-benzoyl-arginyl-p-nitroanilide, Sigma-Aldrich) و SPApNA (*p*-N-succinyl-phenylalanine nitroanilide, Sigma-Aldrich) مطابق روش مورد استفاده توسط تمهن و همکاران (۲۰۰۵) و پریرا و همکاران (۲۰۰۵) به ترتیب برای سنجش فعالیت آنزیم تریپسین و کیموتریپسین استفاده شد.

جهت بررسی میزان مهارکنندگی عصاره‌ی تام و فراکسیون‌های مختلف گیاهی، نمونه‌ی آنزیمی قبل از اضافه کردن سوبسترا به مدت ۱۰ دقیقه با مهارکننده انکوبه شد (بافر گلایسین ۱۰ pH). بقیه‌ی مراحل مشابه روش سنجش فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه صورت گرفت. در تمام مطالعات، از تریپسین و کیموتریپسین گاوی (Bovine pancreas Trypsin and Chymotrypsin, Sigma-Aldrich) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

**تعیین غلظت پروتئین تام نمونه‌ها**

برای تعیین غلظت پروتئین تام نمونه‌ها از روش برادفورد (۱۹۷۶) استفاده شد. پروتئین آلبومن گاوی به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت و با ترسیم و استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پروتئین نمونه‌ها تعیین شد. برای تعیین میزان جذب نمونه‌ها، طول موج ۵۹۵ نانومتر بکار گرفته شد.

**تجزیه‌ی آماری**

داده‌های به‌دست آمده از آزمایش‌های مختلف با آزمون کلموگراف- اسمیرنف از نظر نرمال بودن بررسی شد. تجزیه‌ی آماری داده‌ها با استفاده از نرم-افزار MSTAT-C صورت گرفته و برای مقایسه‌ی

میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده شد. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گردید.

## نتایج و بحث

### اثر مهارکنندگی عصاره‌ی تام و فراکسیون‌های مختلف بر پروتئاز تام گوارشی

بررسی اثر مهارکنندگی عصاره‌ی تام تلخ‌بیان و گاودانه نشان داد که قدرت مهارکنندگی این دو عصاره با هم تفاوت معنی‌داری داشت ($F_{۱،۴}$=۱۸/۸۸، P<۰/۰۱) و عصاره‌ی تام تلخ‌بیان در مقایسه با عصاره‌ی تام گاودانه، پروتئاز گوارشی کرم غوزه‌ی پنبه را بیشتر مهار کرد (۲۰/۷۶±۲/۵۶ درصد در مقابل ۴/۹±۲/۰۸ درصد).

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تاثیر پنج فراکسیون تلخ‌بیان بر پروتئاز تام نشان داد که بین تیمارها تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($F_{۱۰،۴}$=۲۵/۲۳، P<۰/۰۱). مقایسه‌ی میانگین‌ها نشان داد که بیشترین میزان مهارکنندگی از فراکسیون پنجم تلخ‌بیان ناشی گردید (۱۳۳/۶ درصد). فراکسیون اول نیز در مقایسه با سایر فراکسیون‌ها پروتئاز را به طور معنی‌داری بیشتر مهار کرد (۵۳ درصد). از نظر میزان مهارکنندگی بین فراکسیون‌های دوم، سوم و چهارم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (به ترتیب ۱۸/۳، ۱۷/۲ و ۲۰/۷ درصد) (جدول ۱).

تاثیر فراکسیون‌های مختلف گیاه گاودانه در مهار پروتئاز تام معنی‌دار نبود ($F_{۱۰،۴}$=۱/۳۹، P>۰/۰۵). با این وجود، فراکسیون‌های اول و سوم به ترتیب با ۲۱/۸ و ۲۱ درصد مهارکنندگی از بقیه فراکسیون‌ها موثرتر بودند (جدول ۱).

جدول ۱- درصد مهار ویژه‌ی (±SE) فعالیت پروتئاز تام کرم غوزه‌ی پنبه توسط فراکسیون‌های مختلف گیاهان.

| گیاه | فراکسیون‌های مختلف | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | اول (۲۰-صفر) | دوم (۴۰-۲۰) | سوم (۶۰-۴۰) | چهارم (۷۰-۶۰) | پنجم (۸۰-۷۰) |
| تلخ‌بیان | ۵۳/۰۵±۱۵/۸۲ b | ۱۸/۳۹±۰/۱۷ c | ۱۷/۲۱± ۱/۲۹c | ۲۰/۸۰± ۲/۹۲c | ۱۳۳/۶۰±۱۵/۱۹a |
| گاودانه | ۲۱/۸۸± ۵/۴۲a | ۱۵/۹۹±۲/۲۹ a | ۲۱/۰۶± ۰/۸۶a | ۱۳/۸۶±۲/۱۶ a | ۱۷/۲۵±۱/۲۱a |

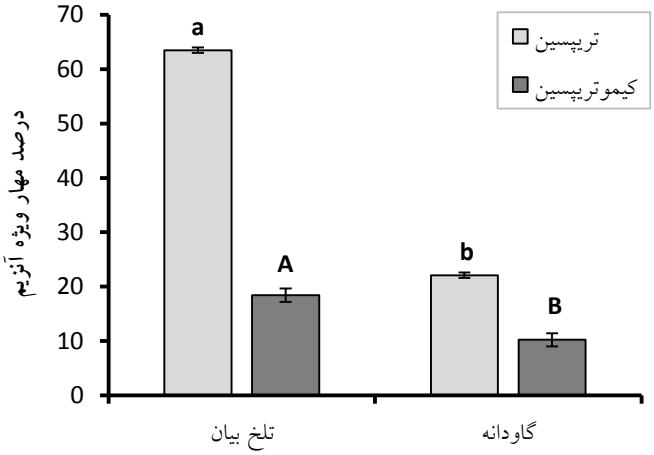
حروف مشابه در هر سطر نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

### اثر مهارکنندگی عصاره‌ی تام و فراکسیون‌های مختلف بر تریپسین و کیموتریپسین گاوی

تاثیر عصاره‌های تام و فراکسیون‌های مختلف بر فعالیت تریپسین و کیموتریپسین گاوی به عنوان شاهد مثبت مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها مشخص کرد که تاثیر عصاره‌ی تام تلخ‌بیان و گاودانه بر مهار تریپسین و کیموتریپسین گاوی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود ($F_{۸،۱}$=۱۳۷۹/۲۷، P<۰/۰۱). شکل ۱ نشان می‌دهد که تاثیر عصاره‌ی تام تلخ‌بیان در مهار تریپسین و کیموتریپسین گاوی بیشتر از گاودانه بود ($F_{۱،۸}$=۶۱۶/۷۱، P<۰/۰۱). میزان مهار فعالیت تریپسین گاوی توسط عصاره‌ی تام دو گیاه بیشتر از کیموتریپسین بود و عصاره‌ی تام تلخ‌بیان تا ۶۳/۵ درصد فعالیت تریپسین را مهار کرد. عصاره‌ی تام گیاه گاودانه ۲۲ درصد فعالیت تریپسین گاوی را مهار کرد که بیشتر از میزان مهار کیموتریپسین توسط عصاره‌ی تام هر دو گیاه بود.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که فراکسیون‌های مختلف تلخ‌بیان ($F_{۱۰،۴}$=۲۷/۳۰، P<۰/۰۱) و گاودانه ($F_{۱۰،۴}$=۸۷/۵۸، P<۰/۰۱) اثر معنی‌داری در مهار فعالیت آنزیم تریپسین گاوی داشتند. مقایسه‌ی میانگین میزان مهارکنندگی فراکسیون‌ها نشان داد که فراکسیون پنجم بذر تلخ‌بیان فعالیت آنزیم را تا ۸۲/۶ درصد کاهش داد و از این نظر با سایر فراکسیون‌ها

تفاوت معنی‌دار داشت (جدول ۲). فراکسیون دوم تلخ‌بیان نیز فعالیت تریپسین گاوی را تا ۲۹/۳ درصد مهارکرد ولی تفاوت معنی‌داری با فراکسیون‌های اول و سوم نشان نداد. کمترین میزان مهار در فراکسیون چهارم مشاهده شد.




**شکل ۱- مقایسه‌ی میانگین اثر مهارکنندگی عصاره‌ی تام گیاهان بر فعالیت تریپسین و کیموتریپسین گاوی.**
**حروف مشابه در هر آنزیم نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.**

در مورد گاودانه فراکسیون‌های دوم و سوم به ترتیب ۲۸ و ۲۵ درصد تریپسین گاوی را مهار کردند ولی از نظر اثر مهارکنندگی بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. سایر فراکسیون‌ها ۱۰-۷ درصد آنزیم تریپسین گاوی را مهار کردند و اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند (جدول ۲).

فراکسیون‌های مختلف گیاهان تلخ‌بیان($F_{۱۰،٤}$=۳٤/۳۳، P<۰/۰۱) و گاودانه ($F_{۱۰،٤}$=٤۰/۱۰، P<۰/۰۱) بر فعالیت آنزیم کیموتریپسین گاوی، با اختلاف معنی‌داری تاثیر داشتند. مقایسه‌ی میانگین‌ها نشان داد که دو فراکسیون چهارم و اول گیاه تلخ‌بیان به ترتیب ٤٥/٦ و ۳۸/۸ درصد فعالیت کیموتریپسین گاوی را مهار کردند (جدول ۲). فراکسیون‌های دوم و سوم با میزان مهار ویژه‌ی ۹ و ۸ درصد کمتر از بقیه در مهار کیموتریپسین گاوی نقش داشتند.

در گیاه گاودانه نیز اختلاف معنی‌داری بین فراکسیون‌های مختلف از نظر تاثیر بر مهار فعالیت آنزیم کیموتریپسین گاوی وجود داشت (جدول۲). فراکسیون اول این گیاه بیش از ۳۱ درصد فعالیت آنزیم را مهار کرد و با سایر فراکسیون‌ها تفاوت معنی‌داری نشان داد. سایر فراکسیون‌ها در کل کمتر از ۱۰ درصد فعالیت کیموتریپسین گاوی را مهار کردند.

## اثر مهارکنندگی عصاره‌ی تام و فراکسیون‌های مختلف بر فعالیت تریپسین و کیموتریپسین کرم غوزه‌ی پنبه

عصاره‌ی تام گیاهان تلخ‌بیان و گاودانه به‌طور معنی‌داری بر فعالیت تریپسین گوارشی کرم غوزه‌ی پنبه اثر مهارکنندگی نشان دادند ($F_{٤،۱}$=۵۸/۸٦، P<۰/۰۱). عصاره‌ی گیاه تلخ‌بیان و گاودانه به ترتیب ٦٥ و ۲۳ درصد فعالیت تریپسین را در کرم غوزه‌ی پنبه کاهش دادند. تجزیه واریانس درصد مهار تریپسن کرم غوزه‌ی پنبه توسط فراکسیون‌های مختلف عصاره‌ی گیاهان تلخ-بیان ($F_{۱۰،٤}$=٤/۰۳، P<۰/۰۵) و گاودانه ($F_{۱۰،٤}$=۱۹/۵۹، P<۰/۰۱) نشان داد که اختلاف معنی‌داری باهم داشتند. فراکسیون اول هر دو گیاه به‌طور معنی‌داری بیشترین اثر مهارکنندگی را نشان داد (جدول۲). مقایسه‌ی میانگین‌ها نشان داد که حساسیت تریپسین کرم غوزه‌ی پنبه نسبت به تلخ‌بیان بیشتر از گاودانه بود. میزان مهار فراکسیون

پنجم در مرتبه دوم بیشتر از بقیه فعالیت آنزیم را کاهش داد (۲۸/۴۱ درصد). فراکسیون سوم تلخ‌بیان کمترین میزان مهار را نشان داد (۵/۷۲ درصد).

جدول ۲- درصد مهار ویژه‌ی(±SE) فعالیت تریپسین و کیموتریپسین توسط فراکسیون‌های مختلف گیاهان.

| گیاه | آنزیم | فراکسیون | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | اول (۲۰-صفر) | دوم (۴۰-۲۰) | سوم (۶۰-۴۰) | چهارم (۷۰-۶۰) | پنجم (۸۰-۷۰) |
| تلخ‌بیان | تریپسین گاوی | ۲۱/۳۶±۴/۷۹bc | ۲۹/۳۵±۰/۱۹b | ۱۷±۱/۳۶bc | ۵/۸۱±۲/۷۰c | ۸۲/۶۰±۱۰/۷۷a |
| | کیموتریپسین گاوی | ۳۸/۸۳±۳/۱۸a | ۹/۳۸±۰/۵۵c | ۸/۷±۲/۸۴c | ۴۵/۶۸±۳/۲۶a | ۲۳/۱۶±۳/۴۷b |
| | تریپسین کرم غوزه‌ی پنبه | ۴۱/۷۹±۱۲/۵۴a | ۲۰/۵۰±۱/۳۹abc | ۵/۷۳±۰/۳۶c | ۱۹/۲۰±۴bc | ۲۸/۴۲±۶/۴۷ab |
| | کیموتریپسین کرم غوزه‌ی پنبه | ۲۵/۴۷±۳/۷۰c | ۱/۸۸±۰/۱۵d | ۴۷/۰۵±۲/۹۷b | ۶۶/۵۹±۶/۸۸a | ۷/۵۶±۱/۸۹d |
| گاودانه | تریپسین گاوی | ۸/۲۱±۲/۵۹b | ۲۸/۰۶±۰/۵a | ۲۵/۶±۰/۶۳a | ۷/۱۸±۰/۸۷b | ۱۰/۵۹±۰/۷۰b |
| | کیموتریپسین گاوی | ۳۱/۳۴±۳/۶۵a | ۷/۲۴±۰/۶۸b | ۹/۳۸±۱/۴۶b | ۳/۸۴±۱/۵bc | ۰/۶۶±۰/۲۷c |
| | تریپسین کرم غوزه‌ی پنبه | ۲۸/۸۰±۴/۹۰a | ۹/۸۸±۱b | ۵/۷۴±۰/۵۶b | ۴/۶۵±۱/۵۲b | ۲/۹۸±۰/۹۰b |
| | کیموتریپسین کرم غوزه‌ی پنبه | ۱۴/۳۷±۳/۱۶b | ۲/۳۰±۰/۱۹c | ۳۷/۸۷±۱/۸۵a | ۸/۱۷±۲/۵۶bc | ۳/۲۴±۰/۸۸c |

حروف مشابه در هر سطر نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

در بین فراکسیون‌های مختلف گیاه گاودانه، فراکسیون اول میزان مهار ۲۸/۷۷ درصدی نشان داد که به‌طور معنی‌دار موثرتر از سایر فراکسیون‌ها بود. در بین اثر مهارکنندگی سایر فراکسیون‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲).

عصاره‌های تام تلخ‌بیان و گاودانه تاثیر معنی‌داری بر فعالیت کیموتریپسین گوارشی کرم غوزه‌ی پنبه نشان دادند ($F_{1,4}$=۶۷/۴، P<۰/۰۱). هر چند میزان مهارکنندگی قابل توجه نبود ولی عصاره‌ی تام گیاه گاودانه با اختلاف معنی‌داری نسبت به تلخ‌بیان کیموتریپسین را بیشتر مهار کرد (۴/۳ درصد).

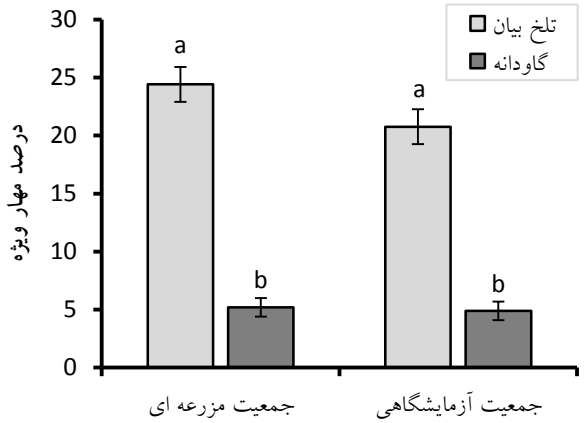
با توجه به نتایج تجزیه واریانس، اختلاف معنی‌داری در مهار کیموتریپسین توسط فراکسیون‌های مختلف تلخ‌بیان ($F_{10,4}$=۴۹/۹۹، P<۰/۰۱) و گاودانه ($F_{10,4}$=۵۱/۲۵، P<۰/۰۱) وجود دارد. بیشترین میزان مهار فعالیت کیموتریپسین با فراکسیون چهارم تلخ‌بیان صورت گرفت (۶۶ درصد) که با سایر فراکسیون‌ها تفاوت معنی‌داری داشت. پس از آن فراکسیون‌های سوم و اول به ترتیب موجب مهار ۴۷ و ۲۵ درصدی کیموتریپسین شدند (جدول ۲). کمترین میزان مهارکنندگی مربوط به فراکسیون دوم بود (۱/۸ درصد).

فراکسیون‌های مختلف عصاره‌ی گاودانه اثر مهارکنندگی متفاوتی نشان دادند (جدول ۲). بیشترین میزان مهار کیموتریپسین در فراکسیون سوم و سپس در اول و چهارم به ترتیب با مهار ۳۷/۸، ۱۴/۳ و ۸/۲ درصدی مشاهده شد. دو فراکسیون دوم و پنجم به مقدار اندکی فعالیت کیموتریپسین را تحت تاثیر قرار دادند (به ترتیب ۲/۳ و ۳/۲ درصد).

**اثر مهارکنندگی عصاره‌ی تام گیاهان بر فعالیت پروتئاز تام جمعیت مزرعه‌ای و آزمایشگاهی کرم غوزه‌ی پنبه**

در مقایسه‌ی اثر مهارکنندگی عصاره‌ی تام گیاهان، مشخص شد که پروتئاز تام گوارشی دو جمعیت مزرعه‌ای و آزمایشگاهی از نظر حساسیت به عصاره گیاهان مورد بررسی تفاوتی نداشتند ($F_{4,8}$=۰/۶۶، P>۰/۰۵) ولی گیاهان مختلف تاثیر معنی‌داری بر هر دو جمعیت نشان دادند ($F_{4,8}$=۵۲/۲۰، P<۰/۰۱).

مقایسه‌ی میانگین‌ها نشان داد که اگر چه میزان مهار پروتئاز تام گوارشی جمعیت مزرعه‌ای بیشتر از جمعیت آزمایشگاهی بود، ولی اختلاف معنی‌داری بین دو جمعیت مشاهده نگردید. در این بررسی نیز مشخص شد تاثیر تلخ‌بیان در مهار پروتئاز تام گوارشی کرم غوزه‌ی پنبه در هر دو جمعیت بیشتر از گاودانه بود (شکل ۲).




**شکل ۲- مقایسه‌ی میانگین اثر مهارکنندگی عصاره‌ی تام گیاهان بر پروتئاز گوارشی جمعیت مزرعه‌ای و آزمایشگاهی کرم غوزه‌ی پنبه. حروف مشابه نشان دهنده‌ی عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵درصد می‌باشد.**

تحقیقات روزافزونی در جهت شناسایی منابع جدید مهارکننده و استفاده از آن‌ها در ایجاد مقاومت در گیاهان حساس به آفات در حال انجام است. کرم غوزه‌ی پنبه نیز به عنوان یکی از مهم‌ترین آفات گیاهان زراعی در سطح جهان مورد هدف این تحقیقات بوده است (ژائو و همکاران ۱۹۹۶، تلنگ و همکاران ۲۰۰۳، چاوگلی و همکاران ۲۰۰۳، گیری و همکاران ۲۰۰۳، تمهن و همکاران ۲۰۰۵، دامل و همکاران ۲۰۰۵، تلنگ و همکاران ۲۰۰۹). اغلب منابع گیاهی انتخاب شده برای مطالعه مهارکنندگی از تیره‌های مختلف وحشی و زراعی گیاهانی مانند نخود، کلم، سیب‌زمینی، گل مینا و غیره بوده‌اند. اگرچه قسمت‌های مختلف گیاهان از نظر تجمع مهارکننده‌های پروتئازها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند ولی تمرکز اغلب تحقیقات روی قسمت‌های ذخیره‌ای گیاهان و به‌ویژه بذر آن‌ها بوده است. در مورد گیاهان تیره‌ی فاباسه، بذر به‌عنوان غنی‌ترین منبع برای جداسازی مهارکننده‌های پروتئازها بیشتر از سایر بخش‌های گیاهی مورد توجه بوده است (پیزولوسکا و پیزولوسکی ۲۰۰۰). در مطالعه‌ی اخیر یک گونه‌ی وحشی از این تیره یعنی تلخ‌بیان و یک گونه‌ی زراعی به‌نام گاودانه برای مطالعات مهارکنندگی انتخاب شدند.

اگرچه میزان مهارکنندگی عصاره‌ی تام گیاهان مورد بررسی در مواردی اندک به‌نظر می‌رسد ولی با توجه به پیچیدگی سیستم گوارشی حشرات و وجود آنزیم‌های گوارشی متعدد به ویژه گروه‌های مختلف پروتئازها (اوزگور و همکاران ۲۰۰۹)، خالص‌سازی این آنزیم‌ها و نیز مهارکننده‌ها ضروری به نظر می‌رسد تا با جزئیات بیشتری این امر مورد بررسی قرار گیرد. (تلنگ و همکاران ۲۰۰۳، فرانکو و همکاران ۲۰۰۳، تلنگ و همکاران ۲۰۰۹).

لین و همکاران (۱۹۸۳) در بررسی جداسازی مهارکننده‌های تریپسین از غدد سیب‌زمینی شیرین (*Ipomoea batatas* Lam.) توزیع مهارکننده‌های تریپسین را در فراکسیون‌های مختلف تهیه شده با کمک نمک سولفات آمونیوم نشان دادند ولی فعالیت مهارکنندگی در فراکسیون‌های ۳۰-۲۰ و ۴۰-۳۰ درصد

بیش از بقیه بود و مهار ویژه‌ی این دو فراکسیون را به ترتیب ۱۷۵ و ۱۱۹ درصد به‌دست آوردند.

باتاچاریا و همکاران (۲۰۰٦) نشان دادند که همگی فراکسیون‌های تهیه شده از دانه‌های گیاه *Archidendron ellipticum* با کمک ترسیب در نمک سولفات آمونیوم اثر مهارکنندگی بالایی بر فعالیت تریپسین گاوی داشتند. نتایج این محققین نشان می‌دهد که، ترسیب در نمک سولفات آمونیوم موجب خلوص نسبی بالای مهارکننده‌ها و تغلیظ آن‌ها شده است به عبارتی استفاده از این نمک برای تخلیص اولیه پروتئین‌های گیاهی جهت غربالگری مهارکننده‌های موجود در آنها از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد.

پروتئازهای گروه سرین و به‌ویژه تریپسین و کیموتریپسین از عمده‌ترین آنزیم‌های گوارشی بالپولک‌داران به‌شمار می‌روند. تمرکز اغلب مطالعات به‌ویژه بر مهار تریپسین این حشرات معطوف بوده است. دامل و همکاران (۲۰۰۵) قسمت‌های مختلف گیاه گوجه‌فرنگی را در جستجوی مهارکننده‌های پروتئاز کرم غوزه‌ی پنبه مورد مطالعه قرار دادند. طی این بررسی مشخص شد که مهارکننده‌های شناسایی شده، فعالیت تریپسین گاوی را بیشتر از کیموتریپسین مهارکردند و این درحالی بود که میزان مهار فعالیت پروتئاز تام کرم غوزه‌ی پنبه کمتر از آنزیم‌های گاوی مورد مطالعه بود (۸۰-۵۰ درصد در مقایسه با ۱۰۰ درصد تریپسین و ۹۰ درصد کیموتریپسین گاوی). در مطالعه حاضرنیز در فراکسیون دوم عصاره‌ی هر دو گیاه همین نتایج مشاهده شد که شاید دلیل آن، خالص بودن آنزیم تریپسین و کیموتریپسین گاوی در مقایسه با کرم قوزه‌ی پنبه باشد. در مطالعه حاضر در کل، تریپسین کرم غوزه‌ی پنبه به میزان بیشتری در مقایسه با کیموتریپسین تحت تاثیر قرار گرفت، که شاید دلیل آن هم مربوط به فعالیت بالای آنزیم تریپسین در مقایسه با کیموتریپسین باشد (تلنگ و همکاران ۲۰۰۳).

گیری و همکاران (۲۰۰۳) عصاره گیاه *Psophocarpus tetragonolobus* را در مورد مهار فعالیت پروتئاز کرم غوزه‌ی پنبه بررسی کردند و طی آن مهارکننده‌ای به‌نام WBTI-1 بیشترین اثر مهارکنندگی بر فعالیت پروتئاز تام کرم غوزه‌ی پنبه نشان داد (۹٤ درصد). همین مهارکننده در غلظت مشابه بکار رفته فقط ۲۲ درصد تریپسین را مهار کرد. بنابراین مهار بالای فعالیت پروتئاز تام کاملا با مهار پروتئاز اختصاصی مانند تریپسین و کیموتریپسین مطابقت ندارد. در بررسی حاضر حدود ۵۵ درصد فعالیت پروتئاز تام کرم غوزه‌ی پنبه توسط فراکسیون اول تلخ‌بیان مهار شد ولی میزان مهار تریپسین گاوی در فراکسیون دوم بیشتر از اول بود. در مواردی هم این تشابه به چشم می‌خورد. به عنوان مثال فراکسیون پنجم تلخ‌بیان فعالیت پروتئاز تام را به میزان بیشتری در مقایسه با سایر فراکسیون‌ها مهار کرد و همین فراکسیون بیشترین تاثیر را بر فعالیت تریپسین گاوی داشت. این موضوع احتمال جدا شدن مهارکننده‌های مختلف در فراکسیون‌های مختلف، که هر کدام به صورت اختصاصی بر فعالیت آنزیم های گوارشی تریپسین و یا کیموتریپسین تاثیر می گذارند را تایید می کند.

تلنگ و همکاران (۲۰۰۹) تاثیر مهارکننده‌ی خالص‌سازی شده دیگری از گیاه *P. tetragonolobus* به‌نام WCI2 را بر فعالیت پروتئاز کرم غوزه‌ی پنبه مورد بررسی قرار دادند. مشخص شد که این مهارکننده پتانسیل بالایی در مهار فعالیت کیموتریپسین دارد. WC12 در یک غلظت واحد، ۵۵ درصد فعالیت پروتئاز تام و ۲۸ درصد فعالیت تریپسین را مهار کرد. به عبارتی نمی‌توان کاملا اذعان داشت که تریپسین و کیموتریپسین، جزو پروتئازهای عمده گوارشی کرم غوزه‌ی پنبه می‌باشند.

در تحقیق فرانکو و همکاران (۲۰۰۳) مهارکننده BTCI خالص‌سازی شده از لوبیا چشم‌بلبلی در غلظت

۱٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر ۱۰۰ درصد فعالیت تریپسین گاوی را مهار کرد و ۹۰ درصد فعالیت تریپسین حشرات کامل سرخرطومی پنبه (*Anthonomus grandis*) توسط همین غلظت مهار شد. این محققین نشان دادند که غلظت ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر مهارکننده، ۱۰۰ درصد فعالیت کیموتریپسین گاوی را مهار کرد ولی تاثیر چندانی بر فعالیت کیموتریپسین لاروی سرخرطومی پنبه نداشت. آنها دلیل عدم تاثیر این مهارکننده بر فعالیت کیموتریپسین را به عدم حساسیت آنزیمی حشره نسبت به مهارکننده و یا حضور لوسین آمینو پپتیداز با توانایی تجزیه و غیرفعال کردن مهارکننده‌ها نسبت دادند. همچنین آنها ابراز داشتند که حشرات از مکانیسم‌های تنظیمی پیچیده‌ای در واکنش به پروتئین‌های مهارکننده برخوردار می‌باشند بنابراین جا دارد فعالیت و اثر مهارکننده‌های شناسایی شده در محیط زنده نیز مورد بررسی قرار گیرد. این امر در بررسی حاضر در مورد فراکسیون پنجم عصاره تلخ‌بیان صادق است به‌طوری که اشاره شد این فراکسیون توانسته حدود ۸۰ درصد از فعالیت تریپسین گاوی را مهار بکند در حالی که ۳۰ درصد فعالیت تریپسین کرم غوزه‌ی پنبه توسط این فراکسیون مهار شد، همچنین بر فعالیت کیموتریپسین گاوی نیز ۲۰ درصد اثر مهارکنندگی داشت در حالی که فقط تا پنج درصد فعالیت کیموتریپسین کرم غوزه‌ی پنبه تحت تاثیر قرار گرفت.

نتایج برخی تحقیقات مشخص کرده است که مهارکننده‌های پروتئینی ژنوتیپ‌های وحشی و گیاهان غیرمیزبان از پتانسیل قابل توجه مهارکنندگی برخوردار هستند (چوگل و همکاران ۲۰۰۳ و گیری و همکاران ۲۰۰۳). هارسولکار و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند که پروتئاز کرم غوزه‌ی پنبه اگر چه به میزان ۳۸ تا ۵۵ درصد توسط مهارکننده‌های گیاهان میزبان این حشره مهار شد، ولی مهارکننده‌های خالص‌سازی شده از منابع گیاهی غیرمیزبان به‌طور کامل فعالیت پروتئاز آن را مهارکردند. چوگل و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که مهارکننده پروتئاز به‌دست آمده از گیاه *Cajanus cajan* به‌طور کامل تریپسین و کیموتریپسین گاوی را مهار کرد ولی تاثیر کمتری بر فعالیت پروتئاز کرم غوزه‌ی پنبه داشت. فعالیت ژنوتیپ‌های وحشی این گیاه تاثیر بیشتری بر پروتئاز کرم غوزه‌ی پنبه داشتند و تا ۸۷ درصد فعالیت پروتئاز را مهار کردند. از این نظر که گیاهان مورد مطالعه در بررسی حاضر میزبان کرم غوزه‌ی پنبه نیستند، فراکسیون‌های شناسایی شده با پتانسیل بالای مهارکنندگی شاید شروع مناسبی برای مطالعات تکمیلی باشند. اندام‌های مختلف گیاهی، وضعیت رشدی گیاه، مرحله رشدی، نحوه‌ی برداشت و نحوه‌ی استخراج عواملی هستند که در شناسایی و خالص‌سازی مهارکننده‌ها مورد توجه قرار دارند (پیزولوسکا و پیزولوسکی ۲۰۰۰، کونارف و همکاران ۲۰۰۲، دامل و همکاران ۲۰۰۵، گوئیلامون و همکاران ۲۰۰۸). همچنین ممکن است انواع متنوع مهارکننده‌ها در یک منبع گیاهی با ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوت وجود داشته باشند ولی اثرات مهارکنندگی آنها متفاوت بوده باشد (لین و همکاران ۱۹۸۳).

اثر مهارکننده‌ها تحت تاثیر شرایط پرورش، نوع میزبان و سنین مختلف لاروی نیز قرار دارد. تلنگ و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که BGPI (Bitter Gourd Proteinase Inhibitor)، تریپسین گاوی را ۱۰۰ درصد مهار کرد ولی فعالیت پروتئازهای کرم غوزه‌ی پنبه جمع‌آوری شده از میزبان‌های مختلف ۷٦-۸۲ درصد مهار شد.

پتانسیل بالای دو گیاه تلخ‌بیان و گاودانه در مهار آنزیم‌های پروتئاز کرم غوزه‌ی پنبه در این بررسی مشخص گردید. طبیعی است مطالعات تکمیلی در جهت انتخاب، خالص‌سازی و شناسایی موثرترین مهارکننده از گیاهان ضروری به نظر می‌رسد.

**تشکر و قدردانی**

نویسندگان مقاله قدردان زحمات همکاران آزمایشگاه شیمی دارویی دانشکده‌ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز بخصوص جناب آقای دکتر حمیدی و مسئول آزمایشگاه عمومی مرکز تحقیقات دارویی تبریز جناب آقای وطن‌خواه هستند.

**منابع**

اسماعیلی م، میرکریمی الف وآزمایش‌فرد پ، ۱۳۸۱. حشره‌شناسی کشاورزی. انتشارات دانشگاه تهران. صفحه‌های ۳۸۲-۳۸۰.

بهداد الف، ۱۳۷٦. آفات گیاهان زراعی ایران. چاپ سوم. انتشارات یادبود. صفحه‌های ۳۱۹ – ۳۱۳.

خانجانی م، ۱۳۸۵. آفات سبزی و صیفی ایران. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه بوعلی سینا، صفحه‌های ۳۷-۳۵.

مصلی نژاد ه، نوروزیان م و محمد بیگی الف، ۱۳۸۱. فهرست آفات، بیماری‌های گیاهی، علف‌های هرز مهم و سموم توصیه شده. چاپ اول . نشر آموزش کشاورزی. ۱۱۲ صفحه.

Bell HA, Fitches EC, Down RE, Ford L, Marris GC, Edwards JP, Gatehouse JA and Gatehouse AMR, 2001. Effect of dietary cowpea trypsin inhibitor (CpTI) on growth and development of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) and on the success of the gregarious ectoparasitoid *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae). Pest Management Science, 57: 57-65.

Bhattacharyya A, Mazumdar S, Leighton SM and Babu CR, 2006. A Kuntiz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: purification, characterization, and kinetic properties. Phytochemistry, 67: 232-241.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Broadway RM, 1993, Purification and partial characterization of trypsin/chymotrypsin inhibitors from cabbage foliage. Phytochemistry, 33: 21-27.

Ceciliani F, Bortolotti F, Menegatti E, Ronchi S, Ascenzi P and palmieri S, 1994. purification, inhibitory properties, amino acid sequence and identification of the reactive site of a new serine proteinase inhibitor from oil-rape (*Brassica napus*) seed. FEBS Letters, 342: 221-224.

Chougule NP, Hivrale VK, Chhabda PJ, Giri AP and Kachole MS, 2003. Differential inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases by proteinase inhibitors of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and its wild relatives. Phytochemistry, 64: 681-687.

Damle MS, Giri AP, Sainani MN and Gupta VS, 2005. Higher accumulation of proteinase inhibitors in flowers than leaves and fruits as a possible basis for differential feeding preference of *Helicoverpa armigera* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill, Cv. Dhanashree). Phytochemistry, 66: 2659-2667.

De Leo F, Bonade-Bottino M, Ceci LR, Gallerani R and Jouanin L, 2001. Effects of mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. Insect Biotechnology and Molecular Biology, 31: 593-602.

De Leo F, Volpicella M, Licciulli F, Liuni S, Gallerani R and Ceci LR, 2002. Plant-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. Nucleic Acid Research, 30: 347-348.

Fitt GP, 1989. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. Annual Review of Entomology, 34: 17 - 52.

Franco OL, Santos RCD, Batista JA N, Mendes ACM, De Araujo MAM, Monnerat RG, Grossi-de-Sa MF and De Freitas SM, 2003. Effets of Black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on protolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. Phytochemistry, 63: 343-349.

Giri AP, Harsulkar AM, Ku MSB, GuptaVS, Deshpande VV, Ranjekar PK and Franceschi V R, 2003. Identification of potato inhibitors of *Helicoverpa armigera* gut proteinases from winged bean seeds. Phytochemistry, 63: 523-532.

Guillamon E, Pedrosa MM, Burbano C, Cuadrado C, Sanchez MC and Muzquiz M, 2008. The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. Food Chemistry, 107: 68-74.

Habib H and Fazili KhM, 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 2: 68-85.

Harsulkar AM, Giri AP, Patankar AG, Gupta VS, Sainani MN, Ranjekar PK and Deshpande VV, 1999. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* Gut proteinases and larval growth. Plant Physiology, 121: 497-506.

Herrero S, Combes E, Van Oers MM, Vlak JM, De Maagd RA and Beekwilder J, 2005. Identification and recombinant expression of a novel chymotrypsin from *Spodoptera exigua*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 35: 1073-1082.

Konarev AV, Anisimova IN, Gavrilova VA, Vachrusheva TE, Konechnaya GY, Lewis M and Shewry PR, 2002. Serine proteinase inhibitors in the compositae: distribution, polymorphism and properties. Phytochemistry, 59: 279-291.

Kundu GC and Sinha NK, 1989. Purification and characterization of proteinase inhibitor from *Artocarpus integrifolia* seeds. Phytochemistry, 28: 725-728.

Lawerence PK and Koundal KR, 2002. Plant proteinase inhibitors in control of phytophagous insects. Electronic Journal of Biotechnology, 5: 93-109.

Lin Y-H, Cheng J-F and Fu H-Y, 1983. Partial purification and some properties of trypsin inhibitors of Sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) roots. Botanical Bulletin Academia Sinica, 24: 103-113.

Matthews M, 1999. Heliothine Moths of Australia. C. S. I. R. O. Publishing, 320 pp.

Ozgur E, Yucel M and Oktem HA, 2009. Identification and characterization of hydrolytic enzymes from the midgut of the Cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Turkish Journal of Agriculture, 33: 285-294.

Pelegrini PB, Lay FT, Murad AM, Anderson MA and Franco OL, 2008. Novel insights on the mechanism of action of alpha-amylase inhibitors from the plant defensin family. Proteins, 73: 719-729.

Pereira ME, Dorr FA, Peixoto NC, Lima-Garcia JF, Dorr F and Brito GG, 2005. Perspectives of digestive pest control with proteinase inhibitors that mainly affect the trypsin-like activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38: 1633-1641.

Pisulewska E and Pisulewski PM, 2000. Trypsin inhibitor activity of legume seeds (peas, chuckling vetch, lentils, and soya beans) as affected by the technique of harvest. Animal Feed Science and Technology, 86: 261-265.

Shorey HH and Hale RL,1965. Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. Journal of Economic Entomology, 58: 522-524.

Smith IM, McNamara DG, Scott PR and Harris KM (eds.), 1992. Quarantine pests for Europe. CAB International, pp. 159-164.

Tamhane VA, Chougule NP, Giri AP, Dixit AR, Sainani MN and Gupta VS, 2005. In vivo and in vitro effect of *Capsicum annum* proteinase inhibitors on *Helicoverpa armigera* gut proteinase. Biochimica et Biophysica Acta, 1722: 156-167.

Telang MA, Giri AP, Pyati PS, Gupta VS, Tegeder M and Franceschi VR, 2009. Winged bean chymotrypsin inhibitors retard growth of *Helicoverpa armigera*. Gene, 431: 80-85.

Telang M, Srinivasan A, Patankar A, Harsulkar A, Joshi V, Damle A, Deshpande V, Sainani M, Ranjekar P, Gupta G, Birah A, Rani S, Kachole M, Giri A and Gupta V, 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. Phytochemistry, 63: 643-652.

Terra WR and Ferreira C, 2005. Biochemistry of digestion. in: Lawrence I. Gilbert, Kostas Iatrou, and Sarjeet S. Gill. Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier. pp. 507.

Zhao Y, Botella MA, Subramanian L, Niu X, Nielsen SS, Bressan RA and Hasegawa PM, 1996. Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. Plant Physiology, 111: 1299-1306.

# Inhibitory Effect of *Goebelia alopecuroides* L. and *Vicia ervilia* L. Extracts on Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* Hb., Digestive Trypsin and Chymotrypsin Activity

**D Mohammadi[1], R Farshbaf Pour Abad[2*], MR Rashidi[3] and SA Mohammadi[4]**

[1]Assistant Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
[2] Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[3]Prof., Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
[4]Prof., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
*Coresponding author: rfpourabad@yahoo.com

Received: 8 Aug 2015 Accepted: 30 Dec 2015

## Abstracts

During evolution, various compounds against herbivors were developed in plant species. Disturbance in digestive system by plant enzyme inhibitors is one of the effective methods in integrated pest managment programs. In this study, the effects of total *Goebelia alopecuroides* and *Vicia ervilia* seed extracts and their fractions were assessed against proteolytic activity of cotton bollworm. Total extracts of *G. alopecuroides* was effectively inhibited digestive proteinase of cotton bollworm compared with that of *V. ervilia*. The inhibitory effect of *G. alopecuroides* on Bovine trypsin and chymotrypsin as well as insects' trypsin and chymotrypsin was higher than that of *V. ervilia*. Total seed extracts of *V. ervilia* significantly decreased digestive chymotrypsin activity. Ammonium sulfate precipitation of seed extract also showed significant inhibitory effect among the fractions. The fifth fraction of *G. alopecuroides* showed the highest inhibititory efect agianst digestive proteolytic activity of cotton bollworm and bovine trypsin. The first fraction of *V. ervilia* significantly inhibited total proteolytic activity.The first fraction of both plants seed extracts inhibited digestive trypsin of cotton bollworm compared to the other fractions. The third fraction of *V. ervilia* and the forth fraction of *G. alopecuroides* showed higher inhibitory effect on digestive chymotrypsin of cotton bollworm comperd with the other fractions. Comparing crude extracts effects of both plant species on laboratory and wild populations of cotton bollworm showed that wild ones was susseptible compared with the laboratory population.

**Keywords:** Chymotrypsin, Cotton bollworm, *Goebelia alopecuroides*, Total protease, Trypsin, *Vicia ervilia.*