نامه‌ی انجمن حشره‌شناسی ایران
۱۶-۱ :(۲)۳۲ - ۱۳۹۱

تأثیر بذر ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی روی فعالیت پروتئولیتیک گوارشی *Helicoverpa armigera* (Lep.: Noctuidae)

ندا فلاح‌نژاد مجرد[۱]، یعقوب فتحی‌پور[۲و*]، کریم کمالی[۲] و بهرام ناصری[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده‌ی کشاورزی، گروه حشره‌شناسی، تهران، ۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی کشاورزی، گروه حشره‌شناسی کشاورزی، تهران، ۳- دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده‌ی کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، اردبیل.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fathi@modares.ac.ir

The effect of seeds of different chickpea and cowpea cultivars on digestive proteolytic activity of *Helicoverpa armigera* (Lep.: Noctuidae)

N. Fallahnejad-Mojarrad[1], Y. Fathipour[2&*], K. Kamali[2] and B. Naseri[3]

1. Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O. Box 14155- 775, Tehran, Iran, 2. Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, P.O. Box 14115-336, Tehran, Iran, 3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

*Corresponding author, E-mail: fathi@modares.ac.ir

چکیده

پروتئازها آنزیم‌های گوارشی عمده در دستگاه گوارش اغلب حشرات به‌شمار می‌آیند که وظیفه‌ی تأمین اسیدهای آمینه و انرژی از منابع غذایی برای رشد و نمو حشره را به‌عهده دارند. فعالیت پروتئولیتیک کل عصاره‌ی روده‌ی میانی لارو کرم غوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* (Hübner)، پرورش‌یافته روی رژیم غذایی مصنوعی تهیه شده از بذر ارقام مختلف نخود (ارقام آرمان، آزاد، بینویچ و هاشم) و لوبیا چشم‌بلبلی (رقم مشهد) روی سوبسترای پروتئینی آزوکازئین در pH ٦ تا ١٢ بررسی شد. آزمایش‌ها در اتاقک رشد با دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ٦٥ درصد و دوره‌ی نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انجام گرفت. نتایج نشان داد که پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیمی لاروهای سنین سوم، چهارم و پنجم به‌ترتیب با تغذیه از ارقام آرمان، بنیویچ و آرمان (به‌ترتیب ٤/٣١، ٤/٢٦ و ٤/٣١ U/mg) و بالاترین میزان فعالیت آنزیمی این لاروها به‌ترتیب با پرورش آن‌ها روی ارقام مشهد، آزاد و مشهد (به‌ترتیب ٦/٦٨، ٦/٣١ و ٦/٦٧ U/mg) به‌دست آمد. فعالیت پروتئولیتیک کل روی همه‌ی ارقام مورد بررسی از pH ٦ تا ١٢ روند افزایشی داشت، به‌طوری‌که pH بهینه‌ی فعالیت آنزیمی در سنین مختلف لاروی روی ارقام مختلف نخود و لوبیای چشم‌بلبلی ١٢ بود. این نشان‌دهنده‌ی بیشینه‌ی فعالیت آنزیم‌های پروتئاز لاروهای *H. armigera* در pH خیلی قلیایی است. نتایج نشان داد که ارقام مشهد و آرمان به‌ترتیب میزبان‌های مناسب و نامناسب برای لاروهای *H. armigera* می‌باشند.

واژگان کلیدی: نخود، لوبیا چشم‌بلبلی، کرم غوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera*، آنزیم‌های گوارشی پروتئاز

Abstract

Proteases are considered as major digestive enzymes in alimentary canals of most insects, which are responsible for providing amino acids and energy from nutrients for insects' growth. The substrate azocasein was used for measuring general proteolytic activity of midgut extracts from *Helicoverpa armigera* (Hübner) larvae reared on different chickpea cultivars (Arman, Azad, Binivich and Hashem) and a cowpea cultivar (Mashhad) when incorporated into artificial diets at different pH values (6 to 12). The experiments were preformed at 25 ± 1C°, 65 ± 5% RH and a photoperiod of 16: 8 (L: D) h. The

دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۷، پذیرش: ۱۳۹۰/۷/۵.

results showed that the lowest general proteolytic activity of the third, fourth and fifth instar larvae was on Arman, Binivich and Arman (4.31, 4.26 and 4.31 U/mg, respectively), while the highest rate was in the larvae fed on Mashhad, Azad and Mashhad (6.68, 6.31 and 6.67 U/mg, respectively), respectively. The general proteolytic activity in *H. armigera* larvae on all examined cultivars had an increasing trend in pH from 6 to 12. The optimum pH value of proteolytic activity in the larvae fed on different cultivars was 12, suggesting the maximum proteolytic activity of *H. armigera* larvae at high alkaline pH. Mashhad and Arman cultivars were the most and the least suitable hosts for *H. armigera*, respectively.
Key words: chickpea, cowpea, cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, protease digestive enzymes

مقدمه

کرم غوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* (Hübner)، یکی از آفات با دامنه‌ی میزبانی وسیع روی انواع محصولات زراعی و باغی در ایران (Farid,1986; Fathipour & Naseri, 2011) و بسیاری از کشورهای جهان (Reddy *et al*., 2004; Yu *et al*., 2008) است که بیش از ۱۸۱ گونه گیاه میزبان زراعی و غیرزراعی متعلق به ٤٥ خانواده‌ی گیاهی دارد (Manjunath *et al*., 1989). براساس گزارش Sudbrink & Grant (1995)، میزبان‌های لارو کرم غوزه‌ی پنبه از ٣٤ گونه‌ی گیاهی متعلق به ۱۱ خانواده می‌باشد. این حشره در سرتاسر دنیا، به‌عنوان آفت اقتصادی محصولاتی نظیر گوجه‌فرنگی (Moral Garcia, 2006) و لوبیا (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) (Kumari *et al*., 2006) به‌شمار می‌رود. هرساله لارو *H. armigera* با تغذیه از محصولاتی نظیر پنبه، ذرت، گوجه‌فرنگی، حبوبات و سبزیجات خسارت غیرقابل جبرانی را به کشاورزان تحمیل می‌کند (Singh & Mullick, 1997; Liu *et al*., 2004). داشتن چهار ویژگی مهم در کرم غوزه‌ی پنبه، شامل دامنه‌ی میزبانی وسیع، قدرت تحرک زیاد از طریق پرواز، باروری زیاد و داشتن دیاپوز غیراجباری، امکان زنده‌مانی در زیستگاه‌های غیرپایدار و سازگاری با تغییرات فصلی را برای این آفت فراهم می‌کند (Fitt, 1989).

روش‌های متعددی برای کنترل حشرات آفت برمبنای روش‌های غیرشیمیایی و کاهش استفاده از آفت‌کش‌ها به‌کار گرفته شده است. غیرفعال‌سازی هضم پروتئین در دستگاه گوارش حشرات منجر به بهره‌برداری ضعیف از منابع غذایی، کندی رشد و نمو و حتی مرگ به‌علت گرسنگی می‌شود (Gatehouse *et al*., 1999). در بین آنزیم‌های گوارشی مؤثر در هضم مواد غذایی، پروتئازها گروهی از آنزیم‌ها را تشکیل می‌دهند که هضم مواد پروتئینی خورده‌شده توسط حشره را به‌عهده دارند. اختلال در متابولیسم اسیدهای آمینه با مهار هضم پروتئین به‌عنوان یک هدف کلیدی برای استفاده در کنترل حشرات مد نظر بوده است

(Hilder *et al*., 1992). باتوجه به اینکه یکی از مهم‌ترین اثرات ترکیبات شیمیایی ثانویه موجود در گیاهان روی آنزیم‌های گوارشی حشرات می‌باشد، لذا بررسی این آنزیم‌ها به‌منظور طراحی دقیق راهبردهای کنترلی مناسب در جهت استفاده‌ی موفقیت‌آمیز از مهارکننده‌های پروتئاز در مدیریت برنامه‌ی تلفیقی آفات ضروری است (Jongsma & Bolter, 1997; Michaud, 1997).

تاکنون پژوهش‌های اندکی درباره‌ی تأثیر میزبان‌های گیاهی مختلف روی فعالیت پروتئولیتیک گوارشی *H. armigera* صورت گرفته است و اغلب مطالعات انجام‌شده روی اثر مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی پروتئاز روی فعالیت پروتئولیتیک گوارشی *H. armigera* می‌باشد (Johnston *et al*., 1993; Giri *et al*., 1998). در پژوهش انجام‌یافته توسط Naseri *et al.* (2010) فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز لارو *H. armigera* تغذیه‌شده با رژیم غذایی مصنوعی (برمبنای لوبیای چشم‌بلبلی) و غلاف ارقام مختلف سویا بررسی شد. باتوجه به اینکه در مورد فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز *H. armigera* روی بذر ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی در قالب رژیم غذایی مصنوعی تاکنون پژوهشی انجام نگرفته است و به‌دلیل اهمیت این آفت از نظر ایجاد خسارت اقتصادی زیاد روی ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی، بررسی‌های انجام‌شده در این زمینه می‌تواند در تعیین مؤثرترین رقم در کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی مفید و قابل استفاده باشد.

مواد و روش‌ها

پرورش آزمایشگاهی *H. armigera* روی غذای مصنوعی

بذر ارقام مختلف نخود، *Cicer arietinum* L. (ارقام آرمان، آزاد، هاشم و بینیویچ) از مؤسسه‌ی تحقیقات کشاورزی دیم (سرآرود) کرمانشاه و بذر لوبیا چشم‌بلبلی، *Vinga sinensis* L. (رقم مشهد) از مرکز تحقیقات ورامین تهیه شد. تخم و سنین مختلف لاروی *H. armigera* از آزمایشگاه گروه حشره‌شناسی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهیه و به اتاقک پرورش با دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، رطوبت نسبی ۵ ± ٦٥ درصد و دوره‌ی نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شد.

پرورش کلنی حشره روی غذای مصنوعی تهیه‌شده با بذر ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی فوق‌الاشاره (هر کدام ۲۲۰ گرم) و مواد اولیه شامل پودر آگار ١٤ گرم، اسید سوربیک ۱/۱ گرم، اسید آسکوربیک ۳/۵ گرم، متیل‌پاراهیدروکسی‌بنزوات ۲/۲ گرم، مخمر ۳۵ گرم، پودر جوانه‌ی گندم ۳۰ گرم، فرمالدئید ۳۷ درصد ۲/۵ میلی‌لیتر، روغن آفتابگردان ۵ میلی‌لیتر و آب مقطر ٦٥٠ میلی‌لیتر (Twine, 1971) صورت گرفت.

تشریح لارو *H. armigera* و استخراج عصاره‌ی آنزیمی

پس از تغذیه‌ی لاروهای آفت از رژیم غذایی مصنوعی برمبنای ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی، لاروهای سنین سوم، چهارم و پنجم ٢٤ ساعته، روی یخ بی‌حس شده و در زیر استریومیکروسکوپ تشریح شدند. روده‌ی میانی لاروها پس از جداسازی از سایر قسمت‌ها، در حجم معینی از آب مقطر سرد در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری شد. سپس روده‌ی میانی لاروها با استفاده از یک هموژنایزر دستی روی یخ همگن شده و مخلوط‌های همگن حاصل در دمای ٤ درجه‌ی سلسیوس در سرعت g × ١٦٠٠٠ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رونشین‌های حاصل به‌منظور سنجش فعالیت پروتئولیتیک کل دستگاه گوارش لارو آفت مورد استفاده قرار گرفتند (Hosseininaveh *et al.*, 2007).

تعیین فعالیت پروتئولیتیک کل روی غذای مصنوعی

برای آزمایش‌های مربوط به تعیین اسیدیته‌ی مناسب برای فعالیت پروتئولیتیک کل از بافر فسفات- بورات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (با اسیدیته‌های ٦ تا ۱۲) استفاده شد. سوبسترای پروتئینی آزوکازئین برای سنجش فعالیت پروتئولیتیک کل عصاره‌ی روده‌ی میانی لاروهای سنین مختلف *H. armigera* در اسیدیته‌های مختلف (اسیدیته ٦ تا ۱۲ با فواصل ۰/۵ واحد) مورد استفاده قرار گرفت (Elpidina *et al.*, 2001). مخلوط واکنش شامل ۸۰ میکرولیتر محلول آزوکازئین ۱/۵ درصد در بافر یونیورسال و ۵۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی بود که به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس انکوبه شد. هضم پروتئینی با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر اسید تری‌کلرواستیک ۳۰ درصد متوقف و آزوکازئین هیدرولیزنشده موجود در واکنش با قرار

دادن در دمای ٤ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت نیم ساعت به‌طور کامل رسوب داده شد. سپس با سرعت g × ۱٦۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. حجم مساوی از سدیم‌هیدروکسید دو نرمال به رونشین اضافه و جذب آن در طول موج ٤٥۰ نانومتر قرائت شد. در شاهد (بلانک)، عصاره‌ی آنزیمی بعد از اضافه کردن اسید تری‌کلرواستیک به مخلوط واکنش افزوده شد. هر یک از آزمایش‌های مربوط به تیمار و شاهد شامل سه تکرار بود.

تعیین غلظت پروتئین نمونه

ازآنجاکه آنزیم‌های گوارشی ساختار پروتئینی دارند و هر چه غلظت آنزیم بیش‌تر باشد فعالیت آنزیمی نیز افزایش می‌یابد، لذا در تعیین غلظت پروتئین موجود در نمونه (منظور از نمونه همان عصاره‌های محتوی آنزیم‌های گوارشی لارو آفت می‌باشد)، با تعیین غلظت آنزیم موجود در نمونه و استفاده از آن در فرمول فعالیت ویژه اثر غلظت روی میزان فعالیت آنزیم حذف می‌شود. غلظت پروتئین نمونه با استفاده از Bio-Rad protein assay براساس روش Bradford (1976) انجام شد. جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر نسبتی از غلظت پروتئین نمونه است. پروتئین سرم گاوی در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۲/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان پروتئین استاندارد در نظر گرفته شد. با ترسیم منحنی استاندارد غلظت پروتئین در محلول‌های پروتئینی به‌دست آمد.

محاسبه‌ی فعالیت ویژه‌ی آنزیم

فعالیت ویژه‌ی آنزیم پروتئاز با استفاده از فرمول $S = (OD \times df) / (VCT)$ محاسبه شد. در این فرمول، S فعالیت ویژه‌ی آنزیم (U/mg)، T مدت زمان انکوباسیون (دقیقه)، V حجم نمونه‌ی آنزیمی مورد استفاده (میلی‌لیتر)، C غلظت پروتئن نمونه (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، OD اختلاف جذب نمونه و بلانک، df فاکتور رقت (مقدار عددی رقیق شدن آنزیم مورد استفاده از شروع آزمایش تا زمان خواندن جذب) و U تغییر در جذب نور در هر دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین نمونه است.

تجزیه‌ی آماری

تجزیه‌ی آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16.1 و SAS 9.1 و مقایسه‌ی میانگین‌ها براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام پذیرفت. برای رسم نمودارها از برنامه‌ی گرافیکی EXCEL و MATLAB استفاده شد. دندروگرام حاصل از تجزیه‌ی کلاستر فعالیت پروتئولیتیک کل عصاره‌ی روده‌ی میانی لاروهای سنین مختلف *H. armigera* روی غذای مصنوعی، به روش Ward با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16.1 رسم شد.

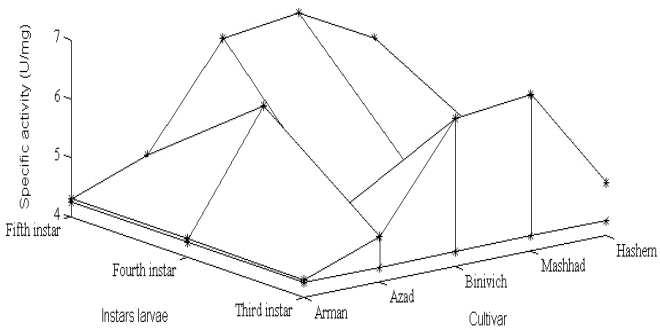
نتایج و بحث

بیش‌ترین فعالیت ویژه‌ی پروتئولیتیک کل عصاره‌ی آنزیمی لاروهای سنین سوم، چهارم و پنجم *H. armigera* روی ارقام مشهد، آزاد و مشهد به‌ترتیب ٦/٦٨، ٦/٣١ و ٦/٦٧ U/mg به‌دست آمد (شکل ۱). کم‌ترین فعالیت آنزیمی این لاروها نیز مربوط به لاروهایی بود که از ارقام آرمان، بینیویچ و آرمان (به‌ترتیب ٤/٣١، ٤/٢٦ و ٤/٣١ U/mg) تغذیه کرده بودند.

به‌طورکلی، در حشرات با افزایش سن لاروی مقدار ترشح آنزیم‌های گوارشی افزایش می‌یابد. به‌عبارت دیگر چنین انتظار می‌رفت که افزایش سن لاروی *H. armigera* از سن سوم تا سن پنجم منجر به افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز شود. بااین‌حال، نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که فعالیت پروتئولیتیک کل در لاروهای سن سوم روی رقم مشهد در مقایسه با سنین چهارم و پنجم اندکی بالاتر بود. این امر ممکن است به‌دلیل حساس‌تربودن پروتئازهای روده‌ی میانی لارو سن سوم به مهارکننده‌های طبیعی موجود در رقم مشهد باشد که به‌منظور جبران اثر مهارکنندگی، ترشح آنزیم‌های گوارشی پروتئاز را افزایش داده‌اند و این کار منجر به افزایش فعالیت پروتئولیتیک کل لارو سن سوم شده است.

نتایج حاصل از فعالیت ویژه‌ی پروتئولیتیک کل عصاره‌ی آنزیمی لاروهای سنین مختلف *H. armigera* پرورش‌یافته روی ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی در قالب رژیم غذایی مصنوعی نشان‌دهنده‌ی اثر معنی‌دار ترکیبات شیمیایی ثانوی (از جمله مهارکننده‌های آنزیمی) موجود در این ارقام روی فعالیت آنزیم‌های پروتئاز بود. باتوجه به تغییر معنی‌دار فعالیت پروتئولیتیک کل در واکنش به تغذیه از ارقام مختلف این احتمال وجود دارد که این تغییرات

مربوط به اثر مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی باشد، هرچند عوامل احتمالی دیگری نیز ممکن است در این امر سهیم باشند.



شکل ۱- فعالیت پروتئولیتیک کل عصاره‌ی روده‌ی میانی لاروهای سن سوم تا پنجم *H. armigera* روی ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی در قالب رژیم غذایی مصنوعی.

Fig. 1. General proteolytic activity of midgut extract from third to fifth instars larvae of *H. armigera* on different chickpea and cowpea cultivars incorporated into artificial diet.

بالا بودن فعالیت پروتئازی کل در لاروهای پرورش‌یافته روی لوبیا چشم‌بلبلی (رقم مشهد) و نخود (رقم آزاد) احتمالاً به‌دلیل وجود مهارکننده‌های پروتئاز در این ارقام بود که با مهار برخی پروتئازهای گوارشی حشره منجر به تولید بیش‌تر آنزیم توسط سلول‌های روده‌ی میانی آفت شده است. نتایج حاصل از بررسی فعالیت پروتئولیتیک کل لاروهای سن پنجم پرورش‌یافته روی غلاف سیزده رقم مختلف سویا و رژیم غذایی مصنوعی (برمبنای لوبیا چشم‌بلبلی) توسط Naseri *et al*. (2010) نشان داد که بیش‌ترین فعالیت پروتئازی کل به‌طور معنی‌داری روی لاروهای تغذیه‌شده با غذای مصنوعی (U/mg ٤/١) بود ولی اختلاف معنی‌داری با فعالیت پروتئولیتیک لاروهای پرورش‌یافته روی غلاف ارقام L17، M4 و Sahar نداشت. کم‌ترین میزان فعالیت آنزیمی مربوط به لاروهایی بود که از رقم M9 (U/mg ١/٧٥) تغذیه کرده بودند. با مقایسه‌ی یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر و نتایج Naseri *et al*. (2010)

می‌توان اذعان نمود که بذر ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی (در قالب غـذای مصـنوعی) در مقایسه با غلاف ارقام مختلف سویا میزبان مناسب‌تری برای *H. armigera* بوده است. میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی پروتئاز در لاروهای تغذیه‌شده روی رژیم غذایی مصنوعی بـه‌دلیـل تعادل غذایی ویژه در مقدار پروتئین و کربوهیدرات موجود در غذای مصنوعی، بالاتر از میـزان فعالیت آنزیم روی میزبان طبیعی است. علاوه‌برآن، رژیم غذایی مصنوعی از ارزش و سـلامت غذایی بالاتری برخوردار است و باعث تکمیل هرچه سریع‌تر دوره‌ی زنـدگی *H. armigera* در مقایسه با میزبان‌های طبیعی می‌شود (Kotkar *et al*., 2009). از سـوی دیگـر، تفـاوت در مقـدار عددی فعالیت آنزیمی لارو این آفت روی لوبیا چشم‌بلبلی در پـژوهش حاضـر در مقایسـه بـا نتایج Naseri *et al*. (2010) احتمالاً به‌دلیل تفاوت در نوع رقم مورد استفاده، شرایط آزمایشگاهی و نوع مواد به‌کار رفته در رژیم غذایی مصنوعی می‌باشد.

لاروهای سن پنجم *H. armigera* پروش‌یافته روی نخـود، *Cicer arietinum* cv. VJay، ۲/۵ تا ۳ برابر فعالیت پروتئازی بیش‌تری نسبت به لاروهای پرورش‌یافتـه روی سـایر میزبـان‌هـای گیـاهی داشـتند (Patankar *et al*., 2001). فعالیـت پروتئـازی بـالا در لاروهـای *H. armigera* پرورش‌یافته روی نخود یا غذای مصنوعی حاوی نخود آردشده ممکن اسـت بـه‌دلیـل مقـادیر بالای پروتئین در غذا یا در اثر واکنش حشره به مهارکننده‌های پروتئاز موجود در غذا باشد کـه به‌طور نسبی فعالیت پروتئازی حشره را مهار می‌کنـد (Giri *et al*., 1998; Patankar *et al*., 2001). لاروهای *H. armigera* احتمالاً برای جبران فعالیـت مهارکننـدگی پـروتئین‌هـای مهـارکننـده‌ی تریپسین بذر نخود، تولید پروتئازهای روده‌ی میانی را افزایش می‌دهند. بااین‌حال، تـأخیری در رشـد و نمـو لارو روی گیـاه میزبـان بـه‌دلیـل وجـود ایـن مهارکننـده‌هـا بـه‌وجـود نمـی‌آیـد (Harsulkar *et al*., 1999). در چنین موقعیت‌هایی وجود پروتئازهای شبه‌الاسـتاز (elastase-like) در روده‌ی میانی *H. armigera* عامل مؤثری در حفاظت پروتئازهای شبه‌تریسپن از مهـار شـدن توسط مهارکننده‌های پروتئاز نخود خواهد بود (Telang *et al*., 2005). بـه‌منظـور تعیـین ارتبـاط معنی‌دار بین سن حشره و رقم بر میزان فعالیت پروتئازی کـل، بـا اسـتفاده از طـرح فاکتوریـل ارتباط بین رقم و سن مشخص شد. نتایج حاصل نشان داد که دو فاکتور سـن لارو و رقـم بـر میزان فعالیت پروتئازی کل اثر معنی‌دار دارند (جدول ۱).

جدول ۱– اثر ارقام و سنین مختلف لاروی بر میزان فعالیت پروتئولیتیک کل *H. armigera*.

Table 1. The effect of the cultivars and different instar larvae on the proteolytic activity of *H. armigera*.

Factors	df	Mean Square	F value	P value
Cultivars	5	1.86	61.94	< 0.001
Instars	3	2.09	69.49	< 0.001
Cultivars × Instars	8	2.03	76.57	< 0.001

باتوجه به اینکه برای سه سن لاروی سوم، چهارم و پنجم *H. armigera* مقدار فعالیت ویژه‌ی پروتئولیتیک کل اندازه‌گیری شد، لذا مقدار اختلاف فعالیت ویژه‌ی پروتولیتیک کل در تصویر سه‌بعدی نمایش داده شده است (شکل ۱). براساس گزارش‌های Patankar *et al*. (2001) بیش‌ترین میزان فعالیت پروتئینازهای روده‌ی میانی *H. armigera* مربوط به سن ماقبل آخر بود و در سن آخر این فعالیت کاهش یافت. بنابراین، چنین به نظر می‌رسد که سن ماقبل آخر (در این پژوهش، سن چهارم) باید به‌عنوان خسارت‌زاترین مرحله‌ی رشدی باشد. یکی از دلایل بالاتر بودن فعالیت آنزیمی سنین سوم و پنجم نسبت به سن چهارم می‌تواند مربوط به خطای آزمایش‌ها باشد. باتوجه به اینکه لارو حشرات نزدیک به پوست‌اندازی یا اندکی بعد از پوست‌اندازی تغذیه‌ی خود را متوقف کرده و محتوای غذای موجود در دستگاه گوارش را تخلیه می‌کنند، لذا این احتمال وجود دارد که انتخاب لاروهای سن چهارم برای تشریح روده‌ی میانی در این دوره‌ی زمانی صورت گرفته است. بنابراین، مقدار عددی فعالیت پروتئولیتیک کل آن نسبت به سنین لاروی سوم و پنجم کم‌تر به‌دست آمد. همچنین می‌توان اذعان کرد که رقم مشهد دارای ترشح آنزیم بیش‌تر بوده و *H. armigera* خسارت بیش‌تری روی رقم مشهد ایجاد کرده است، به‌عبارت دیگر رقم مشهد در قیاس با ارقام دیگر رقم حساس‌تری بوده است. ازطرفی مقدار عددی کارایی تبدیل غذای هضم‌شده‌ی مربوط به لارو سن پنجم پرورش‌یافته روی رقم مشهد (*ECD* = ۰/۲۸۳۵) در مقایسه با رقم آرمان (*ECD* = ۰/۲۸) موید نتیجه‌ی قبلی مبنی بر حساس بودن این رقم نسبت به سایر ارقام آزمایش شده می‌باشد. *ECD* شاخص مهم در ارتباط با سودمندی غذای هضم‌شده است. کارایی تبدیل غذای هضم‌شده مشخص کننده‌ی بخشی از غذای جذب شده است که در واقع تبدیل به بافت زنده‌ی حشره می‌شود. غذاهای با کارایی تبدیل پائین اغلب ممکن است برای حشره نامطلوب بوده و یا هزینه‌ی هضم و جذب

مواد غذایی آن‌ها بالا باشد. کارایی تبدیل غذای هضم‌شده‌ی بالاتر نشان‌دهنده‌ی مطلوبیت غذا است (Koul *et al*., 2004)، لذا بالا بودن کارایی تبدیل غذای هضم‌شده‌ی مربوط به رقم مشهد نسبت به سایر ارقام مختلف نخود نشان‌دهنده‌ی کیفیت بهتر غذا و همچنین وجود مواد غذایی لازم برای حشره در رقم مشهد می‌باشد.

اسیدیته‌ی روده‌ی میانی حشرات از عوامل اساسی تأثیرگذار بر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی است (Terra & Ferreira, 1994). فعالیت پروتئولیتیک کل روی غذای مصنوعی حاوی ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی در سنین مختلف لاروی از اسیدیته‌ی ٦ تا ۱۲ روند افزایشی داشت (جدول ۲). نتایج نشان داد که اسیدیته‌ی بهینه‌ی فعالیت آنزیم پروتئاز حاصل از لاروهای سنین مختلف تغذیه‌شده با رژیم غذایی مصنوعی (حاوی ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی) ۱۲ بود که نشان‌دهنده‌ی بهینه‌ی فعالیت آنزیمی پروتئاز آفت در اسیدیته‌ی خیلی قلیایی است. بالا بودن اسیدیته‌ی روده‌ی میانی در برخی حشرات روی میزبان‌های گیاهی خاص، به‌منظور تغذیه و هضم بهتر عناصر غذایی موجود در میزبان ضروری است (Clark, 1999). اسیدیته‌ی بالا و ایجاد محیط قلیایی در روده‌ی میانی لارو بال‌پولک‌داران احتمالاً به‌دلیل سازگاری اجداد برگ‌خوار این راسته از حشرات برای هضم همی‌سلولوز دیواره‌ی سلول گیاهان میزبان می‌باشد (Terra & Ferreira, 1994). اسیدیته‌ی بهینه‌ی فعالیت پروتئازهای روده‌ی میانی *H. armigera* تغذیه‌شده با رژیم غذایی مصنوعی (برمبنای لوبیا چشم‌بلبلی) برابر با ۱۲، غلاف ارقام مختلف سویا ۱۲–۱۱ (Naseri *et al*., 2010) و غلاف نخود ۱۱–۱۰ گزارش شده است (Telang *et al*., 2005).

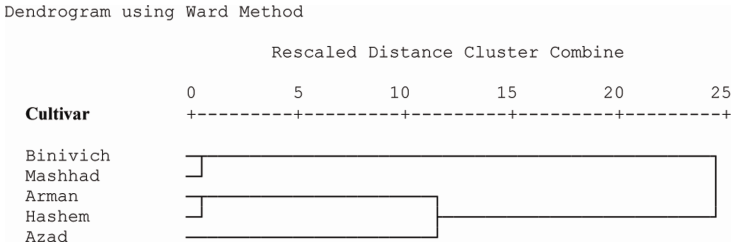
نتایج حاصل از تجزیه‌ی کلاستر، ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی را به دو گروه تقسیم نمود: ارقام بینیویچ و مشهد به‌دلیل تولید بیش‌تر آنزیم پروتئاز در گروه A و ارقام آرمان، آزاد و هاشم به‌دلیل تولید کم‌تر آنزیم پروتئاز در گروه B قرار گرفتند (شکل ۲). ارقام گروه A به‌عنوان ارقام حساس معرفی می‌گردند. در گروه B که خود به دو دسته تقسیم شده است، ارقام آرمان و هاشم به‌عنوان ارقام مقاوم و رقم آزاد به‌عنوان رقم نیمه‌مقاوم معرفی می‌شوند. در مورد سایر نتایج حاصل از این پژوهش و در مقایسه با پژوهش انجام‌شده توسط Naseri *et al*. (2010) که برمبنای رژیم غذایی مصنوعی ارقام مختلف سویا و غلاف ارقام مختلف سویا روی سن

جدول ۲- مقایسه‌ی میانگین (± خطای معیار) فعالیت پروتئولیتیک کل عصاره‌ی روده‌ی میانی سنین سوم، چهارم و پنجم لاروی *H. armigera* در چند pH مختلف روی غذای مصنوعی برمبنای ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی.

Table 2. Comparison of mean (± SE) general proteolytic activity of midgut extract of third, fourth and fifth instar larvae of *H. armigera* in different pH and cultivars of chickpea and cowpea incorporated into artificial diet.

pH	Arman	Azad	Binivich	Mashhad	Hashem
			Third instar		
6	0.28 ± 0.005L	0.27 ± 0.005L	0.48 ± 0.005M	0.48 ± 0.005L	0.48 ± 0.005L
6.5	0.30 ± 0.007K	0.29 ± 0.005K	0.50 ± 0.005K	0.47 ± 0.005L	0.51 ± 0.005K
7	0.36 ± 0.003J	0.33 ± 0.005J	0.63 ± 0.005K	0.77 ± 0.005K	0.69 ± 0.005J
7.5	0.66 ± 0.006I	0.66 ± 0.005I	0.84 ± 0.003J	0.80 ± 0.005J	0.71 ± 0.005I
8	0.72 ± 0.007H	0.68 ± 0.005H	0.90 ± 0.002I	0.97 ± 0.005I	1.10 ± 0.005H
8.5	0.75 ± 0.008G	0.71 ± 0.005G	0.92 ± 0.001H	1.10 ± 0.005H	1.66 ± 0.005G
9	0.21 ± 0.009F	1.18 ± 0.005F	1.41 ± 0.005G	1.50 ± 0.005G	1.84 ± 0.005F
9.5	1.55 ± 0.001E	1.49 ± 0.005E	1.50 ± 0.005F	2.50 ± 0.005F	2.00 ± 0.005E
10	1.72 ± 0.002E	1.55 ± 0.005E	1.55 ± 0.005E	2.57 ± 0.005E	1.40 ± 0.005D
10.5	1.75 ± 0.003D	1.68 ± 0.005D	1.85 ± 0.004D	2.73 ± 0.005D	2.84 ± 0.005C
11	1.95 ± 0.004C	1.71 ± 0.005C	2.00 ± 0.003C	2.93 ± 0.005C	3.21 ± 0.005B
11.5	1.94 ± 0.005B	1.73 ± 0.005B	2.20 ± 0.001B	3.10 ± 0.005B	3.21 ± 0.005B
12	1.99 ± 0.009A	2.30 ± 0.005A	2.20 ± 0.001A	3.30 ± 0.005A	3.84 ± 0.005A
P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
F	13419.8	13419.8	9936.69	35008.3	39495.4
			Fourth instar		
6	0.27 ± 0.005L	0.29 ± 0.005L	0.62 ± 0.005L	0.50 ± 0.005L	0.50 ± 0.005M
6.5	0.39 ± 0.005K	0.31 ± 0.007K	0.65 ± 0.005K	0.51 ± 0.005L	0.50 ± 0.005L
7	0.45 ± 0.005J	0.37 ± 0.003J	0.70 ± 0.007J	0.80 ± 0.005K	0.77 ± 0.005K
7.5	0.75 ± 0.005I	0.68 ± 0.002I	0.90 ± 0.003I	0.82 ± 0.005J	0.80 ± 0.003I
8	0.81 ± 0.005H	0.81 ± 0.001H	0.95 ± 0.020G	1.00 ± 0.005I	1.12 ± 0.002I
8.5	0.82 ± 0.005G	0.85 ± 0.009G	0.93 ± 0.010H	1.40 ± 0.005H	1.74 ± 0.001H
9	1.30 ± 0.005F	1.28 ± 0.008F	1.50 ± 0.006F	1.90 ± 0.005G	1.93 ± 0.005G
9.5	1.65 ± 0.005E	1.40 ± 0.007E	1.10 ± 0.009F	2.90 ± 0.005F	2.08 ± 0.005F
10	1.80 ± 0.005D	1.51 ± 0.006D	1.65 ± 0.008E	2.77 ± 0.005E	2.42 ± 0.005E
10.5	1.82 ± 0.005D	1.52 ± 0.004D	1.75 ± 0.007D	2.80 ± 0.005D	2.93 ± 0.004D
11	2.10 ± 0.005C	1.73 ± 0.003C	2.25 ± 0.005C	3.00 ± 0.005C	3.29 ± 0.003C
11.5	2.40 ± 0.005B	1.75 ± 0.002B	2.50 ± 0.005B	3.20 ± 0.005B	3.33 ± 0.001B
12	2.42 ± 0.005A	2.39 ± 0.009A	3.00 ± 0.005A	3.40 ± 0.005A	3.93 ± 0.001A
P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
F	12649.3	13419.8	17460.3	40883.2	37596.2
			Fifth instar		
6	0.50 ± 0.005L	0.65 ± 0.005M	1.10 ± 0.005G	0.50 ± 0.005M	0.50 ± 0.005K
6.5	0.71 ± 0.007K	1.00 ± 0.005L	1.50 ± 0.005F	0.70 ± 0.005L	0.70 ± 0.005J
7	0.71 ± 0.003K	1.10 ± 0.005K	2.15 ± 0.005E	0.90 ± 0.005K	0.71 ± 0.005J
7.5	0.80 ± 0.005I	1.15 ± 0.005I	2.16 ± 0.005E	1.00 ± 0.005I	1.10 ± 0.005I
8	0.90 ± 0.003I	1.30 ± 0.005I	2.17 ± 0.005E	1.10 ± 0.005I	1.12 ± 0.005H
8.5	1.02 ± 0.002H	1.55 ± 0.005H	3.15 ± 0.005D	1.60 ± 0.005H	1.14 ± 0.005G
9	1.20 ± 0.001G	1.80 ± 0.005G	3.16 ± 0.005D	2.20 ± 0.005G	1.20 ± 0.005F
9.5	1.40 ± 0.006F	1.85 ± 0.005F	3.17 ± 0.005D	2.70 ± 0.005F	1.25 ± 0.005E
10	1.60 ± 0.005E	1.87 ± 0.005E	3.18 ± 0.005D	3.10 ± 0.005E	1.26 ± 0.005 E
10.5	1.50 ± 0.007D	1.89 ± 0.005D	3.19 ± 0.005D	3.50 ± 0.005D	1.40 ± 0.005D
11	1.81 ± 0.008C	1.91 ± 0.005C	4.15 ± 0.005C	4.00 ± 0.005C	1.45 ± 0.005C
11.5	2.05 ± 0.009B	2.10 ± 0.005B	4.15 ± 0.005B	4.21 ± 0.005B	1.50 ± 0.005B
12	2.71 ± 0.004A	2.50 ± 0.005A	5.00 ± 0.005A	4.60 ± 0.005A	2.20 ± 0.005A
P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
F	7953.3	8054.50	545.27	17476.5	5495.8

Means followed by same letters in each column are not significantly different (Duncan Multiple Rang Test, P < 0.01).



شکل ۲- دندروگرام ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی برمبنای فعالیت پروتئولیتیک کل عصاره‌ی آنزیمی روده‌ی میانی لاروهای سنین سوم تا پنجم *H. armigera*.

Fig. 2. Dendrogram of different chickpea and cowpea cultivars based on general proteolytic activity of midgut extract of third, forth and fifth instar larvae of *H. armigera*.

پنجم ۲٤ ساعته انجام شده است، می‌توان چنین نتیجه گرفت که ارقام مختلف سویا، نخود و لوبیا چشم‌بلبلی (رقم مشهد) برمبنای رژیم غذایی مصنوعی بسیار مطلوب‌تر از غلاف ارقام مختلف سویا می‌باشد، چراکه رژیم غذایی مصنوعی به‌دلیل کامل بودن مواد غذایی مناسب‌تر از غلاف ارقام مختلف حبوبات و بقولات است و حشره زودتر چرخه‌ی زندگی خود را کامل می‌کند و به مرحله‌ی بلوغ می‌رسد. اما در مقایسه‌ی غلاف ارقام مختلف سویا، نخود و لوبیا چشم‌بلبلی (مشهد) برمبنای رژیم غذایی مصنوعی، می‌توان چنین نتیجه گرفت که لوبیا چشم‌بلبلی رقم مناسب‌تری برای پرورش انبوه کرم غوزه‌ی پنبه می‌باشد. در مورد سنین مختلف لاروی می‌توان چنین استنباط کرد که با افزایش سن لاروی، میزان ترشح آنزیم بیش‌تر و حشره در سنین بالاتر، به‌ویژه سنین چهارم و پنجم، خسارت‌زاتر بوده است. علت ترشح بیش‌تر آنزیم نیز به‌دلیل تغذیه‌ی بیش‌تر حشره در سنین بالا برای کامل کردن چرخه‌ی زندگی و رسیدن به مرحله‌ی بلوغ می‌باشد. لذا، هرچه رقم مورد تغذیه برای حشره مناسب‌تر بوده، میزان ترشح آنزیم، و متعاقباً میزان خسارت، بیش‌تر و چرخه‌ی زندگی حشره کوتاه‌تر بوده است.

براساس تلفیق یافته‌های پژوهش حاضر با نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های تغذیه‌ای لارو *H. armigera* (اطلاعات منتشرنشده) می‌توان اذعان نمود که رقم آرمان به‌عنوان رقم مقاوم و رقم مشهد به‌عنوان رقم حساس به *H. armigera* در مقایسه با سایر ارقام مورد بررسی

می‌باشند، چراکه شاخص کارایی تبدیل غذای هضم‌شده در رقم مشهد (*ECD* = ۰/۱۹۳) بیش‌تر از رقم آرمان (*ECD* = ۰/۱۳٤) بود. باید به این نکته نیز توجه کرد که نسل سوم کرم غوزه‌ی پنبه روی این ارقام برده شد و این *ECD* مربوط به سنین لاروی سوم تا ششم است. شایان ذکر است که این شاخص اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین، وزن شفیره‌ی نر و ماده در رقم مشهد (به‌ترتیب ۲۸٤/۰٤ و ۳۰٤/۹۷ میلی‌گرم) بسیار بیش‌تر از رقم آرمان (به‌ترتیب ۱۹۰/۵٦ و ۲۲۱/٦۰ میلی‌گرم) بود که نشان می‌دهد رقم مشهد میزبان مناسب‌تری برای رشد و نمو مراحل قبل از بلوغ *H. armigera* می‌باشد.

باتوجه به فعالیت ویژه‌ی پروتئولیتیک کل و گروه‌بندی آن به ارقام حساس، مقاوم و نیمه مقاوم، و با در نظر گرفتن اینکه ارقام مختلف نخود و لوبیا چشم‌بلبلی (رقم مشهد) در سنین مختلف لاروی سنین سوم تا پنجم مورد بررسی قرار گرفته، می‌توان چنین اذعان نمود که مقدار ترشح آنزیم در سنین مختلف لاروی سوم تا پنجم متفاوت بوده است. همچنین، باتوجه به اینکه این اختلاف در ترشح مقدار آنزیم در سنین مختلف لاروی از نظر آماری معنی‌دار است، می‌توان به این نتیجه رسید که سن چهارم لاروی روی رقم مشهد (حساس‌ترین رقم) خسارت‌زاترین بوده است. لذا بالا بودن فعالیت پروئتاز کل در لاروهای پرورش‌یافته روی رقم مشهد احتمالاً به‌دلیل وجود مهارکننده‌های پروتئاز در این رقم بوده که با مهار برخی پروتئازهای گوارشی حشره منجر به تولید بیش‌تر آنزیم توسط سلول‌های روده‌ی میانی آفت شده است.

منابع

Bradford, M. (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.

Clark, T. M. (1999) Evolution and adaptive significance of larval midgut alkalinization in the insect superorder Mecopterida. *Journal of Chemical Ecology* 25, 1945-1960.

Elpidina, E. N., Vinokurov, K. S., Gromenko, V. A., Rudenskaya, Y. A., Dunaevsky, Y. E. & Zhuzhikov, O. P. (2001) Compartmentalization of proteinases and amylases in

Nauphoeta cinerea midgut. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48, 206-216.

Farid, A. (1986). Study of bollworm *Heliothis armigera* (Hübner) on tomato in Jiroft and Kahnuj. *Applied Entomology and Phytopathology* 54, 15-24. [In Persian with English summary].

Fathipour, Y. & Naseri, B. (2011) Soybean Cultivars Affecting Performance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology, Tzi-Bun Ng (Ed.), ISBN: 978-953-307-219-7, InTech, DOI: 10.5772/14838. Available from: http://www.intechopen.com/books/soybean-biochemistry-chemistry-and-physiology/soybean-cultivars-affecting-performance-of-helicoverpa-armigera-lepidoptera-noctuidae-

Fitt, G. P. (1989) The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosytems. *Annual Review of Entomology* 34, 17-53.

Gatehouse, A. M. R., Norton, E., Davison, G. M., Babbe, S. M., Newell, C. A. & Gatehouse, J. A. (1999) Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. *Journal of Insect Physiology* 45, 545-558.

Giri, A. P., Harsulkar, A. M., Deshpande, V. V., Sainani, M. N., Gupta, V. S. & Ranjekar, P. K. (1998) Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by pod borer gut proteinases. *Plant Physiology* 116, 393-401.

Harsulkar, A. M., Giri, A. P., Patankar, A. G., Gupta, V. S., Sainani, M. N., Ranjekar, P. K. & Dashpande, V. V. (1999) Successive use of non-host plant protease inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. *Plant Physiology* 121, 497-506.

Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. R. & Boulter, D. (1992) Transgenic plants conferring insect tolerance: protease inhibitor approach. pp. 310-338 in Kung, S. & Wu, R. (Eds) *Transgenic plants*. 383 pp. Academic Press, New York, USA.

Hosseininaveh, V., Bandani, A., Azmayeshfard, P., Hosseinkhani, S. & Kazzazi, M. (2007) Digestive proteolytic and amylolytic activities in *Trogoderma granarium* Everts (Dermestidae: Coleoptera). *Journal of Stored Products Research* 43, 515-522.

Johnston, K. A., Gatehouse, J. A. & Anstee, J. H. (1993) Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology* 39, 657-664.

Jongsma, M. A. & Bolter, C. (1997) The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 43, 885-895.

Kotkar, H. M., Sarate, P. J., Tamhane, V. A., Gupta, V. S. & Giri, A. P. (2009) Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. *Journal of Insect Physiology* 55, 663-670.

Koul, O., Singh, G., Singh, R., Singh, J., Daniewski, W. M. & Berlozecki, S. (2004) Bioefficacy and mode-of-action of some limonoids of salannin group from *Azadirachta indica* A. Juss and their role in a multicomponent system against lepidopteran larvae. *Journal of Bioscience* 29, 409-416.

Kumari, D. A., Reddy, D. J. & Sharma, H. C. (2006) Antixenosis mechanism of resistance in pigeonpea to the pod borer, *Helicoverpa armigera*. *Journal of Applied Entomology* 130, 10-14.

Liu, Z., Li, D., Gong, P. & Wu, K. (2004) Life table studies of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on different host plants. *Environmental Entomology* 33, 1570-1576.

Manjunath, T. M., Bhatnagar, V. S., Pawar, C. S. & Sithanantham, S. (1989) Economic importance of *Heliothis* spp. in India and an assessment of their natural enemies and host plants. *Proceedings of the Workshop on Biological Control of Heliothis*: *increasing the effectiveness of natural enemies*, 197-228.

Michaud, D. (1997) Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. *Trends in Biotechnology* 15, 4-6.

Moral Garcia, F. J. (2006) Analysis of the spatio-temporal distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) in a tomato fields using a stochastic approach. *Biosystems Engineering* 93, 253-259.

Naseri, B., Fathipour, Y. Moharramipour, S., Hosseininaveh, V. & Gatehouse, A. M. R. (2010) Digestive proteolytic and amylolytic activities of *Helicoverpa armigera* in response to feeding on different soybean cultivars. *Pest Management Science* 66, 1316-1323.

Patankar, A. G., Giri, A. P., Harsulkar, A. M., Sainani, M. N., Deshpande, V. V., Ranjekar, P. K. & Gupta, V. S. (2001) Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 453-464.

Reddy, K. S., Rao, G. R., Rao, P. A. & Rajasekhar, P. (2004) Life table studies of the capitulum borer, *Helicoverpa armigera* (Hübner) infesting sunflower. *Journal of Entomological Research* 28, 13-18.

Singh, A. K. & Mullick, S. (1997) Effect of leguminous plants on the growth and development of gram pod borer, *Helicoverpa armigera*. *Indian Journal of Entomology* 59, 202-214.

Sudbrink, D. L. & Grant, J. F. (1995) Wild host plants of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) in eastern Tennessee. *Environmental Entomology* 24, 1080-1085.

Telang, M. A., Giri, A. P., Sainani, M. N. & Gupta, V. S. (2005) Characterization of two midgut proteinases of *Helicoverpa armigera* and their interaction with proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 51, 513-522.

Terra, W. R. & Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109, 1-62.

Twine, B. H. (1971) Cannibalistic behaviour of *Heliothis armigera* (Hub.). *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences* 28, 153-157.

Yu, F. L., Wu, G., Liu, T. J., Zhai, B. P. & Chen, F. J. (2008) Effects of irrigation on the performance of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) during different pupal stages. *International Journal of Pest Management* 54, 137-142.