

امکان‌سنجی کاربرد چند استروئید گیاهی به‌عنوان حشره‌کش‌های زیستی از طریق
بررسی مدل‌های برهمکنش آن‌ها با گیرنده‌های اکداستروئیدی
کرم غوزه، *Helicoverpa armigera* و بالتوری سبز، *Chrysoperla carnea*

آرزو حیدرزاده، اروج ولیزادگان، محمود جوکار

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

مسئول مکاتبات: آرزو حیدرزاده، پست الکترونیک: arezoo.heydarzade@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۰۸

۴ (۲) ۵۵-۶۹

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۹/۱۶

چکیده

کرم غوزه پنبه (*Helicoverpa armigera* Hübner (Lep.: Noctuidae) یکی از آفات مهم و کلیدی پنبه در ایران و جهان است. این گونه دارای دامنه‌ی وسیع میزبانی می‌باشد و هر ساله خسارت غیرقابل جبرانی به کشاورزان تحمیل می‌کند. در سال‌های اخیر محققین در جستجوی یافتن فناوری تولید حشره‌کش‌های بی‌خطری هستند که دارای ویژگی‌هایی از قبیل نحوه‌ی اثر انتخابی بیشتر روی حشرات هدف و خطرات زیست محیطی کمتر روی موجودات غیرهدف باشند. در این میان حشره‌کش‌های مختل کننده پوست اندازی بسیار مورد توجه واقع شده‌اند. در این مقاله سعی شده تا با استفاده از غربال‌گری مجازی توسط داکینگ مولکولی مدل‌های برهمکنش گیرنده‌های اکدیزونی و تعدادی استروئید گیاهی که در سال‌های ۲۰۱۳ تا ۲۰۱۵ در بانک ترکیبات استروئیدی به ثبت رسیده است، به کارگیری این ترکیبات در کنترل *H. armigera* با کمترین اثر سوء روی بالتوری سبز *Chrysoperla carnea* به‌عنوان دشمن طبیعی آن امکان‌سنجی شود. در این راستا مدل گیرنده‌های اکدیزون آفت و بالتوری سبز طراحی و برآورد کارایی شد. شاخص Z-score، کیفیت مدل گیرنده EcR ساخته شده برای کرم غوزه و بالتوری سبز را به ترتیب معادل روش‌های NMR و X-ray Crystallography دانست. نتایج نشان داد که در بین استروئیدهای گیاهی مورد بررسی، استروئیدهای 2,3,14,20,26-PENTAHYDROXY-6-OXO-11-HYDROXY-20-DEOXYSHIDASTERONE، CALLEDYSTEROL A,B,C، STIGMAST-7-ENE-22,26-LACTOL و GLUTINOSTERONE کمترین ثابت بازداری (K_i)، منفی‌ترین انرژی پیوند و کمترین میزان تغییرات RMSD در هنگام اتصال به گیرنده هدف اکدیزون آفت را دارا هستند و همچنین در اتصال به گیرنده‌های اکدیزونی بالتوری سبز بسیار کم اثر ظاهر شدند. لذا استروئیدهای گیاهی ذکر شده از پتانسیل بالایی برای کنترل کرم غوزه برخوردار بوده و تأثیر بسیار کمی در برهم زدن چرخه زندگی بالتوری سبز خواهند داشت.

واژه‌های کلیدی: داکینگ مولکولی، کرم غوزه پنبه، گیرنده‌ی اکدیزونی، همولوژی مدل

مقدمه

به‌صورت شبانه‌روزی در تلاش هستند تا به این مهم دست یابند. با این وجود یافتن ترکیب مناسب از بین میلیون‌ها ماده‌ی سنتز شده و حتی آن‌هایی که سنتز نشده‌اند بسیار زمان‌بر و هزینه‌بر است. لذا امروزه این شرکت‌ها استراتژی خود را تغییر داده و سعی می‌کنند تا به‌جای بررسی خواص حشره‌کشی تعداد زیادی ترکیب که هزینه‌های بسیار زیادی را بر آن‌ها تحمیل می‌کند سنجیده‌تر عمل نموده و تعداد مواد کمتری را به‌صورت تجربی مورد ارزیابی قرار دهند

امروزه افزایش مقاومت در بسیاری از عوامل خسارت‌زا نسبت به سموم رایج و هم‌چنین خطرات زیست محیطی ناشی از این سموم، سبب محدودیت در به‌کارگیری آن‌ها شده است. از این رو جستجو برای سموم جدید با کارایی بالاتر که از لحاظ اقتصادی به‌صرفه بوده و توسط عموم افراد جامعه نیز قابل تهیه باشد از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است (Pimentel, 2002). شرکت‌های سنتزکننده‌ی سموم

(2011). هر ساله لارو این حشره با تغذیه از محصولات نظیر پنبه، ذرت، گوجه‌فرنگی، حبوبات و سبزیجات خسارت غیرقابل‌جبرانسی را به کشاورزان تحمیل می‌کند (Liu et al., 2004). براساس مطالعات انجام شده گونه‌ی *H. armigera* با ۹۸٪ فراوانی مهمترین گونه‌ی خسارت‌زا در مزارع پنبه‌ی گرگان و گنبد می‌باشد (Mojeni et al., 2000). بررسی‌ها روی کرم غوزه‌ی پنبه نشان می‌دهد که هر لارو آفت در طول دوره‌ی زندگی خود به ۶ تا ۲۰ غنچه و غوزه خسارت می‌زند و میزان خسارت آن در شمال ایران در سال‌های عادی بین ۱۰ تا ۲۵ و در سال‌های طغیانی ۵۰ تا ۷۵ درصد محصول برآورد شده است (Mojeini et al., 2005). بالتوری سبزی *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae) از جمله دشمنان طبیعی این آفت است که به‌عنوان یک شکارگر با گسترش جهانی، به‌دلیل مقاومت بالا نسبت به طیف وسیعی از حشره‌کش‌ها به‌صورت یک عامل بیولوژیکی مؤثر به‌طور گسترده در سیستم‌های کشاورزی به‌کار گرفته می‌شود (Albuquerque et al., 1994; Vogt, 1994; Senior & McEwen, 2001; Zotti et al., 2012). خطرات زیست‌محیطی ناشی از کاربرد بی‌رویه آفت‌کش‌ها، گزارش مقاومت بالای کرم غوزه به آفت‌کش‌های مرسوم نظیر اندوسولفان، پایرتروئیدها، سموم فسفره و کاربامات (Ahmad, 2007) و از بین رفتن موجودات غیر هدف به‌ویژه دشمنان طبیعی آفات گرایش قابل توجه‌ای را در تغییر راهبردهای مدیریتی *H. armigera* ایجاد کرده است (Naseri et al., 2009). مبارزه با این آفت کلیدی با رعایت نقش حشرات مفید موجود در زیست‌بوم، نیازمند توسعه سموم بسیار اختصاصی است که کاملاً هدف‌مند نقطه‌ای از مراحل زندگی و رشد و نمو کرم غوزه را هدف گرفته و آن را کنترل نماید. یکی از محبوب‌ترین ترکیبات، IGR می‌باشند که به‌صورت تجاری نیز در دسترس قرار دارند. این ترکیبات در حقیقت آنالوگ‌های هورمون پوست اندازی یا اکدیزون می‌باشند. از آنجایی که اکدیزون، هورمون استروئیدی اختصاصی بی‌مهرگان است، در طی چند دهه‌ی اخیر گیرنده‌های اکدیزونی (EcR) (Ecdysone receptor)

(Kuhr & Motoyama, 1998). به‌همین دلیل استفاده از روش‌های غربال‌گری مجازی (Virtual Screening) در این صنعت از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به این‌که فیزیولوژی بسیاری از آفات به‌طور دقیق مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است، لذا می‌توان مرحله‌ی خاصی از چرخه‌ی زندگی و یا به‌طور دقیق‌تر چرخه‌ی سلولی آفت را به‌صورت هدفمند در نظر گرفته و آفت‌کش خاصی را برای آن مرحله طراحی و تولید نمود (Acton, 2011). با توجه به اهمیت بسیار زیاد و حیاتی پروتئین‌ها همچون آنزیم‌ها، گیرنده‌های آنزیمی و هورمونی در چرخه‌ی سلولی موجودات زنده می‌توان ترکیبات خاصی را برای غیرفعال کردن آن‌ها طراحی نمود. امروزه با استفاده از روش‌های کامپیوتری می‌توان برهمکنش یک ترکیب معین با یک پروتئین را به‌صورت مجازی شبیه‌سازی نمود (Ghadari, 2012). هم‌چنین می‌توان با ایجاد تغییرات لازم در ترکیب، حداکثر همکنش با پروتئین مورد نظر را ایجاد نمود. این عمل موجب می‌شود تا ترکیباتی به‌صورت آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گیرند که دست‌کم به‌صورت مجازی بهتر از سایر ترکیبات عمل نموده‌اند. با این روش احتمال مؤثر بودن یک ترکیب نیز افزایش می‌یابد که در نهایت موجب کاهش هزینه‌های تحقیقات و کاهش هزینه‌ی تمام شده برای تولید سموم نوین می‌شود (Acton, 2011; Young, 2009). در نتیجه حشره‌کش تولید شده با قیمت کمتری در بازار عرضه شده و در دسترس افراد بیشتری قرار خواهد گرفت. استفاده از غربال‌گری مجازی می‌تواند نه‌تنها برای شرکت‌های تولیدی سموم بلکه برای شیمیدان‌های سنتزی نیز بسیار مفید واقع گردد (Acton, 2011; Ghadari, 2012).

کرم غوزه‌ی پنبه *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) یکی از آفات مهم و کلیدی پنبه در جهان (Reddy et al., 2004; Yu et al., 2008) و در ایران (Farid, 1986; Fathipour & Naseri, 2011) می‌باشد. این گونه دارای دامنه‌ی وسیعی از گیاهان میزبان شامل محصولات زراعی، سبزیجات و گیاهان وحشی می‌باشد (Moral Garcia, 2006; Fathipour & Naseri,

کاهش وزن و نیز سایر آسیب‌های متابولیکی و نهایتاً مرگ می‌شود (Schmelz, et al., 2002). از نظر شیمیایی فیتوآکدایستروئیدها، جزء کلاس تری‌ترپنوئیدها هستند، گروهی از ترکیبات که شامل ساپونین تری‌ترپرن، فیتواستروئول و فیتوآکدایستروئیدها می‌باشند. در گیاهان، فیتوآکدایستروئیدها از موالونیک اسید، از طریق مسیر موالونات در داخل سلول‌های گیاهی و با استفاده از استیل-کوآزیم A به عنوان آغازگر ساخته می‌شود (Ghosh & laddha, 2006). بیش از ۲۵۰ آنالوگ آکدایستروئید در گیاهان شناسایی شده است و به نظر می‌رسد که در حدود ۱۰۰۰ ترکیب ساختاری می‌تواند در طبیعت وجود داشته باشد (Dinan, 2001). تعداد زیادی از گیاهان تحت برخی از شرایط استرس‌زا و حمله‌ی حیوانات قادر به تولید فیتوآکدایستروئید می‌باشند (Dinan et al., 2001). از جمله گیاهان و قارچ‌هایی که قابلیت تولید فیتوآکدایستروئید را دارند می‌توان به *Achyranthes bidentata*، *Leuzea*، *Pfaffia paniculata*، *Tinospora cordifolia*، *Serratula*، *Rhaponticum unuflorum*، *carthamoides*، *Asparagus* و *Cordyceps coronata* اشاره کرد (Gao et al., 2000; Dinan, 2001). مطالعه‌ی گیرنده‌ی هورمون‌های آکدایستروئیدی (EcR) و ترسیم مدل‌های همولوژی آن، منجر به شناسایی دقیق‌تر موادی می‌شود که بیشترین و یا کمترین برهم کنش را با EcR یک حشره ایجاد می‌کند. لذا بررسی و ترسیم مدل‌های همولوژی EcR در هر حشره و مطالعه کیفیت برهم کنش آن با ترکیبات مختلف می‌تواند نقش مهمی در شناسایی دقیق ترکیبات و یا فیتوآکدایستروئیدهای موثر در کنترل آن حشره را داشته باشد. تاکنون یک مدل ساختاری مناسب برای EcR کرم غوزه‌ی پنبه، *H. armigera* و دشمن طبیعی‌اش بالثوری سبز ارائه نشده است. بنابراین بر آن شدیم که با استفاده از مدل همولوژی، مدل ساختاری EcR را برای هر دو حشره توصیف کنیم. هم‌چنین در این پژوهش با به‌کارگیری غربال‌گری مجازی با استفاده از داکینگ مولکولی مدل‌های برهم‌کنش گیرنده‌ی آکدایستروئیدی و تعدادی استروئیدی گیاهی که در سال‌های ۲۰۱۳ تا ۲۰۱۵ در بانک ترکیبات

به‌عنوان یک محل هدف محتمل برای ساخت حشره‌کش‌های ایمن محیط زیستی ارائه شده است. این حشره‌کش‌ها بر روی نواحی بیوشیمیایی خاص در گروه‌های خاصی از حشرات عمل می‌کند (Retnakaran, et al., 2003). آکدایستروئیدها همچون ۲۰-هیدروکسی آکدیزین؛ هورمون طبیعی پوست‌اندازی حشرات؛ از طریق تشکیل کمپلکس‌های هتروداایمر عامل با USP (ultraspiracle protein) به گیرنده‌ی اکدیزون (EcR) متصل شده و بدین ترتیب نقش مهمی در تنظیم رشد و تولید مثل حشرات و سخت پوستان ایفا می‌کنند (Billas & Moras, 2005; Nakagawa & Henrich 2009;) (Fahrbach et al., 2012; Zotti et al., 2012). گیرنده‌های EcR متعلق به بالا خانواده‌ی گیرنده‌های هسته‌ای می‌باشند. گیرنده‌های این بالا خانواده واجد حداقل یکی از دو ناحیه (domain) به‌شدت حفاظت شده می‌باشد: ناحیه‌ی متصل شونده به DNA که در مرکز قرار گرفته است (DBD) (DNA binding domain) و ناحیه‌ی اتصال-لیگاند (LBD) (Ligand binding domain) که در منطقه‌ی C-terminal قرار دارد (Yao et al., 1993; Billas et al., 2009). LBD علاوه بر شناسایی لیگاند، نقش محوری در سیگنال‌دهی وابسته به لیگاند دارد. LBD دارای نواحی دایمری و هم‌کلرد فعال‌سازی وابسته به لیگاند است که مستلزم قرارگیری و موقعیت صحیح مارپیچ فعال‌سازی واقع در ناحیه‌ی C-ترمینال رسپتور می‌باشد (Moras & Gronemeyer, 1998; Yong et al., 2003). هورمون اکدیزون با اتصال به ناحیه‌ی اتصال مولکول گیرنده‌ی (EcR-LBD) به صورت متابولیت فعال خود یعنی 20E عمل می‌کند. یکی از منابع طبیعی استروئیدی که توانمندی کافی برای ورود به حوزه‌ی کنترل آفات را دارد استروئیدهای گیاهی می‌باشد. فیتوآکدایستروئیدها، آکدایستروئیدهای مشتق از گیاهان می‌باشد که به‌منظور دفاع در برابر حشرات گیاه خوار در گیاه تولید می‌شود. این ترکیبات مقلد هورمون‌هایی هستند که توسط حشرات در فرایند پوست‌اندازی تولید می‌شوند. تغذیه‌ی حشرات از گیاهان دارای این مواد موجب پوست‌اندازی پیش از بلوغ،

انرژی با استفاده از GROMO96 گنج‌انیده شده در نرم‌افزار Swiss PDB Viewer صورت گرفت (Guex, et al., 1997). اعتبارسنجی و انتخاب بهترین مدل سه بعدی براساس برآورد مکانی کیفیت مدل و QMEAN6 (Local Model Quality Estimation) برآورد ساختارهای هندسی و استریوشیمی با استفاده نمودار رام‌چاندران (کیفی سنجی ساختار هندسی) (Geometric qualification) با وضوح (Å) ۲/۵ ProSA-Web (Ramachandran, et al., 1963) و سرور Wiederstein, et al., 2007) صورت گرفت و تأیید ساختار سه بعدی توسط سرور Verify 3D (Eisenberg, et al., 1997) انجام شد. ترکیبات زائد ساختار سه بعدی در نرم افزار MOE (Molecular Operating Environment,) (Chemical Computing Group Inc., Montreal, QB, Canada) حذف شد. ساختار EcR/usp هتروداپمر به‌دست آمده با استفاده از پروتکل steepest (0.02) (Å) S.d. Sice descent (100 step) Conjugate gradient (10 step) به‌حداقل انرژی (Energy Minimization) رسانده شد. کلیه ساختارهای سه بعدی فیتواکدایستروئیدها معرفی شده در شکل (۱) توسط نرم افزار ChemSketch رسم و بعد از حداقل رسانی انرژی، هیدروژن‌ها و بارهای الکتریکی افزوده گشت. مدل‌های ساخته شده و مدل‌های اصلاح شده فیتواکدایستروئید جهت بررسی‌های داکینگ به نرم افزار MOE وارد شد.

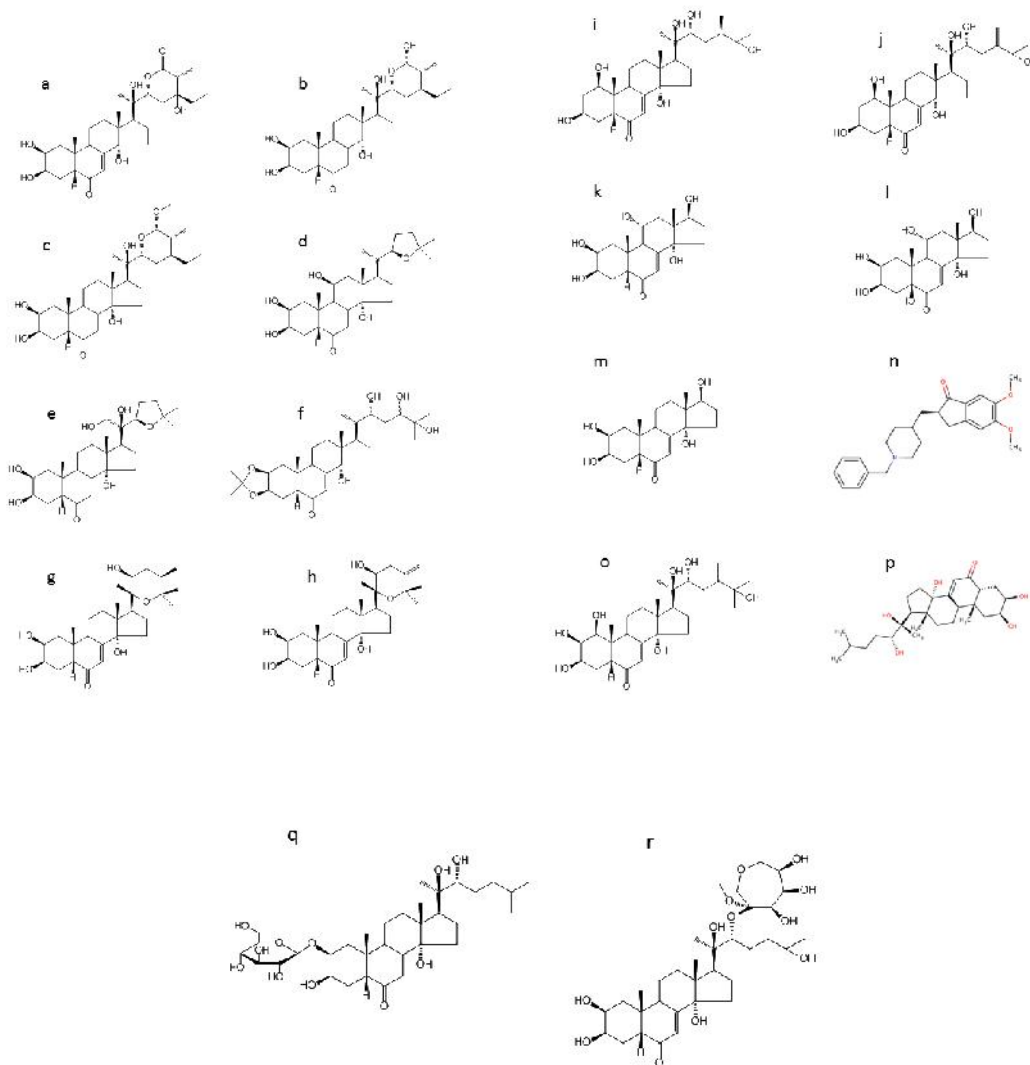
داکینگ براساس پارامترهای (Å) 6 Cutoff, force Placement: rescoring: dG, field: AMBER99 Triangle Matcher تنظیم شد. از بین ۱۰۰ کنفورماسیون پیشنهادی داکینگ، پرتکرارترین کنفورماسیون کلاستر (Cluster) اول به‌عنوان نماینده برهمکنش گیرنده با فیتواکدایستروئید انتخاب شد. سپس پارامترهای مهم در اتصال لیگاند به گیرنده‌ی اکدیژونی در مورد کنفورماسیون نماینده هر برهمکنش مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر اتصال توسط LigX تهیه شد.

استروئیدی به‌ثبت رسیده (<http://ecdybase.org>)، امکان به‌کارگیری این استروئیدهای گیاهی در مبارزه با کرم غوزه با کمترین اثر سو بر روی دشمن طبیعی آن، بالتوری سبز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این بخش باتوجه به اهمیت گونه‌ی *H. armigera* در ایران، تمرکز اصلی پژوهش بر روی ارزیابی برهمکنش گیرنده‌ی اکدیژونی این حشره با گزینه‌های احتمالی فیتواکدایستروئیدهایی می‌باشد که پتانسیل کافی برای تقلید از هورمون پوست‌اندازی و القا فرایند پوست‌اندازی در آفت مذکور را داشته باشند. غربال‌گری فیتواکدایستروئیدها با مقایسه‌ی میزان شباهت عملکرد با الگوی مرجع انجام شد.

در این پژوهش به‌دلیل عدم وجود ساختار سه بعدی (3D) گیرنده‌ی اکدیژون کرم غوزه و بالتوری به‌دلیل عدم تحقیقات مدل‌سازی در بانک ساختارهای سه بعدی (<http://www.rcsb.org>)، ساختار سه بعدی گیرنده‌های مدنظر با استفاده از تکنیک Homology modeling از روی الگوهای مشابه ساخته شد. مراحل همولوژی مدل توسط سرور آنلاین SWISS-MODEL انجام شد. برای ساخت ساختار سه بعدی گیرنده‌ی اکدیژون کرم غوزه و بالتوری سبز از توالی پروتئین‌های گیرنده به شماره‌ی B9UCQ4 و E5LLB1 از سایت Uniport (<http://www.uniprot.org>) (به ترتیب doi: 10.1016/j.mce.2009.10.018 و doi: 10.1007/s10646-012-0852-0) استفاده گردید. به‌منظور تهیه‌ی ساختارهای سه بعدی به‌روش همولوژی مدل توالی‌های مذکور به‌سرور SWISS-MODEL وارد و براساس ۵۰ ساختار سه بعدی گیرنده‌های اکدیژون حشرات دیگر (به‌عنوان قالب) ساخته شد. مدل‌هایی با کمترین امتیاز QMEAN6 Z-score از روند مدل‌سازی حذف و تنها بالاترین امتیاز Z-score برای پالایش و اعتبارسنجی بیشتر مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین حداقل رساندن



شکل ۱- استروئیدهای گیاهی به‌ثبت رسیده در بانک ترکیبات استروئیدی (<http://ecdybase.org>) طی سال‌های ۲۰۱۳ تا ۲۰۱۵: (a) 2,3,14,20,24-PentaHydroxy-6,26-Dioxo-Stigmast-7-Ene-22,26-Olide, (b) 2,3,14,20,26-PentaHydroxy-6-Oxo-Stigmast-7-Ene-22,26-Lactol, (c) 2,3,14,20-TetraHydroxy-26-Methoxy-6-OXO-Stigmast-7-Ene-22,26-Lactol, (d) 11 -Hydroxy-20-DeoxyShidasterone, (e) 21-HydroxyShidasterone, (f) 24-Hydroxyecdysone 2,3-Acetonide, (g) AervEcdysteroid A, (h) AervEcdysteroid B, (i) AervEcdysteroid C, (j) AervEcdysteroid D, (k) CallEcdysterol A, (l) CallEcdysterol B, (m) CallEcdysterol C, (n) E20, (o) GlutinOsterone, (p) P1A, (q) PonaSteoside B, (r) SeptanoEcdysone.

Fig. 1. Phytoecdysteroids were reported during 2013-2015, on the URL: <http://ecdybase.org> (a) 2,3,14,20,24-PentaHydroxy-6,26-Dioxo-Stigmast-7-Ene-22,26-Olide, (b) 2,3,14,20,26-PentaHydroxy-6-Oxo-Stigmast-7-Ene-22,26-Lactol, (c) 2,3,14,20-TetraHydroxy-26-Methoxy-6-OXO-Stigmast-7-Ene-22,26-Lactol, (d) 11 -Hydroxy-20-DeoxyShidasterone, (e) 21-HydroxyShidasterone, (f) 24-Hydroxyecdysone 2,3-Acetonide, (g) AervEcdysteroid A, (h) AervEcdysteroid B, (i) AervEcdysteroid C, (j) AervEcdysteroid D, (k) CallEcdysterol A, (l) CallEcdysterol B, (m) CallEcdysterol C, (n) E20, (o) GlutinOsterone, (p) P1A, (q) PonaSteoside B, (r) SeptanoEcdysone.

نتایج و بحث

بررسی اعتبارسنجی (Validation) مدل‌های EcR ایجادشده

پس از ساخت و طراحی گیرنده‌ی اکدی‌زونی براساس الگوهای همولوژی مدل، اعتبارسنجی مدل‌های EcR طراحی شده براساس شاخص‌های برآورد مکانی، برآورد ساختارهای هندسی و استرئوشیمی صورت پذیرفت. طول ریشه‌های آمینو‌اسیدی EcR متعلق به کرم غوزه ۵۴۵ بود که ۸۳ اسید آمینه غیر مؤثر در الگوسازی حذف گردید. خاطر نشان می‌گردد توالی اسیدهای آمینه حذف شده، هیچ نقشی در اطراف جایگاه‌های فعال احتمالی شناسایی شده توسط MOE نداشت. در نهایت از بین ۵۰ الگو پیش‌گویی شده با استفاده از روش همولوژی مدل، سه مدل برای هر کدام از گیرنده‌ی EcR کرم غوزه و بالتوری انتخاب شد. از بین این سه مدل، برای هر حشره مدلی با بیشترین Z-score برای توالی اسیدهای آمینه، انتخاب و سپس از نظر پایداری ترمودینامیکی و پالایش و اعتبارسنجی بیشتر مورد بررسی قرار گرفت. در امتیازدهی توسط شاخص QMEAN6 از شش پارامتر از داده‌ها که داری الگوی خطی است، استفاده شده و هر کدام از این پارامترها در بازه‌ی بین ۱-۰ ارزش‌دهی می‌شود. این پارامترها شامل All-atom pairwise، C_beta interaction energy، Torsion angle energy، Solvation energy، energy Solvent و Secondary structure agreement accessibility agreement می‌باشد. در نهایت QMEAN6 Z-score که برآیند تمامی پارامترهای مذکور است نشان می‌دهد کیفیت مدل طراحی شده با رزولوشن کدام روش تجربی (Crystallography و یا NMR) نزدیک می‌باشد، اگرچه ممکن است کیفیت مدل طراحی شده در هیچ کدام از دو روش X-ray crystallography و NMR ننگنجد و بدین ترتیب مدل ساخته شده رد می‌شود (Benkert, et al., 2011). در این پژوهش گیرنده‌ی اکدی‌زون مدل‌سازی شده آفت، از نظر کیفیت با روش آزمایشگاهی بسیار شبیه بوده و حتی در روش با دقت بالاتر یعنی NMR نیز جای گرفته است (شکل ۲a). در مورد مدل

گیرنده‌ی بالتوری سبز با وضوح کمتر در محدوده‌ی روش کریستالوگرافی قرار گرفت (شکل ۲b). همان‌طور که در شکل (۳) مشاهده می‌شود کیفیت مکانی مدل (local model quality) برآورد شده است. نمودار انرژی برای هر اسید آمینه در گیر در ساختار ثانویه محاسبه شده است. در کل انرژی‌های مثبت بخش‌های از پروتئین گیرنده را نشان می‌دهد که دارای مشکل و یا در مراحل بعدی نوسانات، بی‌اندازه انرژی را بروز می‌دهند. اگر انرژی برای تک تک اسیدهای آمینه دخیل محاسبه می‌گشت شاهد یک نوسانات بسیار غیر متعارف بودیم بنابراین برای جلوگیری از این پدیده هر ۱۰ و ۴۰ اسید آمینه را به‌عنوان یک گروه در نظر گرفته و در مرحله‌ی بعدی اولین اسید آمینه حذف و به‌جای آن اسید آمینه ۱۱ و یا ۴۱ در نظر گرفته و میانگین انرژی آن‌ها محاسبه می‌گردد. نتایج آنالیز انرژی مدل‌ها نشان داد که مدل گیرنده‌ی اکدی‌زون *H. armigera* دارای نوسانات معقول بود در حالی که در مدل EcR بالتوری سبز *C. carnea* در تعدادی از اسیدهای آمینه دخیل در استیم-لوپ‌هایش (Stem-Loop) نوسانات انرژی بیشتری مشاهده شد (شکل ۳). نتایج امتیازدهی X-score و برآورد مکانی کیفیت پروتئین کاملاً با معیارهای مدل‌سازی مطرح شده توسط Wiederstein & Sippl (2007) هم‌سو بود.

در ادامه شاخص‌های ژئومتری (Geometry) به‌صورت دقیق‌تری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده‌ی صحیح بودن چرخش (rotamers) باندها، زاویه‌بندی (angles) و صحت تشکیل باندها می‌باشد (جدول ۱). کیفیت استرئوشیمی و صحت مدل پیش‌بینی شده با استفاده از نمودار رامانچاندران انجام شد. مدل‌های پیش‌بینی شده با استفاده از پروتکل مذکور برای گیرنده‌ی اکدی‌زونی کرم غوزه و بالتوری به‌ترتیب شامل ۹۷/۶۱ و ۹۶/۲۶ درصد ریشه‌هایی بود که در ناحیه مطلوب نمودار رامانچاندران قرار می‌گرفت، اگرچه در هر کدام از حشرات مذکور به‌ترتیب ۲/۳۰ درصد و ۲/۷۲ درصد ریشه‌ها در نواحی اجازه داده نشده (نامطلوب) نمودار رامانچاندران قرار داشتند. البته تعریفی که در سرور MolProbity برای آنالیز داده‌ها ارایه شده است، بسیار سخت‌گیرانه می‌باشد، به‌طوری که نواحی

سنجیده شد. RMSD در واقع میزان تغییر لیگاند پس از اتصال را با الگوی اولیه آن یعنی پیش از اتصال می‌سنجد. هرچه میزان این تغییرات کمتر باشد نشان دهنده‌ی مناسب‌تر بودن لیگاند است به طوری که با کمترین تغییر در جایگاه فعال گیرنده‌ی خود جای می‌گیرد. تنظیمات داکینگ بایستی تمام جایگاه‌های بالقوه گیرنده‌ی اکتیزون را شامل شود. نتایج حاصل از داکینگ در جدول (۲) ارایه شده است. در واقع استروئیدهای گیاهی در اتصال با EcR موفق‌تر هستند که علاوه بر شاخص‌های بهینه داکینگ از نظر نحوی پیوند و جایگاه اسیدهای آمینه درگیر با استروئیدهای مرجع E20 (هورمون اصلی پوست اندازی) و PIA عملکردی یکسان داشته باشند. یکی از مهم‌ترین پارامترهای در ارزیابی برهمکنش، انرژی اتصال بالا (مقدار عددی منفی‌تر) بین گیرنده‌ی-لیگاند می‌باشد. نتایج نشان داد که از بین استروئیدهای گیاهی مورد بررسی، استروئیدهای 2,3,14,20,26- Hydroxy-20-Deoxyshidasterone -11، 2,3,14,20,26- Pentahydroxy-6-Oxo-Stigmast-7-Ene-22,26-Lactol، Callecysterol A,B,C و Glutinosterone در یک گروه آماری و در بالاترین گروه از نظر مقایسه‌ی انرژی پیوند قرار گرفتند. در استروئیدهای مذکور همچنین کمترین ثابت بازدارنده (K_i)، و کمترین میزان تغییرات RMSD نسبت به سایر استروئیدهای گیاهی مورد بررسی، در هنگام اتصال به گیرنده هدف اکتیزون آفت مشاهده شد. یافته‌های سایر محققین (Di Leva et al., 2014) نشان دهنده‌ی این موضوع است که گیرنده‌ی را که لیگاند آن با کمترین RMSD در جایگاه فعال جای می‌گیرد می‌توان به عنوان یک کنفورماسیون پایدار تلقی نمود. در نتیجه اتصال استروئیدهای گیاهی مطلوب فوق‌الذکر را می‌توان یک پیوند مناسب با استقرار لیگاند در جایگاه فعال گیرنده‌ی اکتیزون قلمداد کرد. تعداد باندهای هیدروژن در هر اتصال یک نقطه کلیدی در ارزیابی قدرت پیوند است. شناسایی جایگاه فعال (Active Site) یک بخش بسیار مهم در ردیابی برهمکنش‌های ماکرومولکول‌ها می‌باشد. نکته‌ی مهم این که اسیدهای آمینه دخیل در برهمکنش استروئیدهای گیاهی منتخب با EcR در غربال‌گری داکینگ هم‌پوشانی بسیار

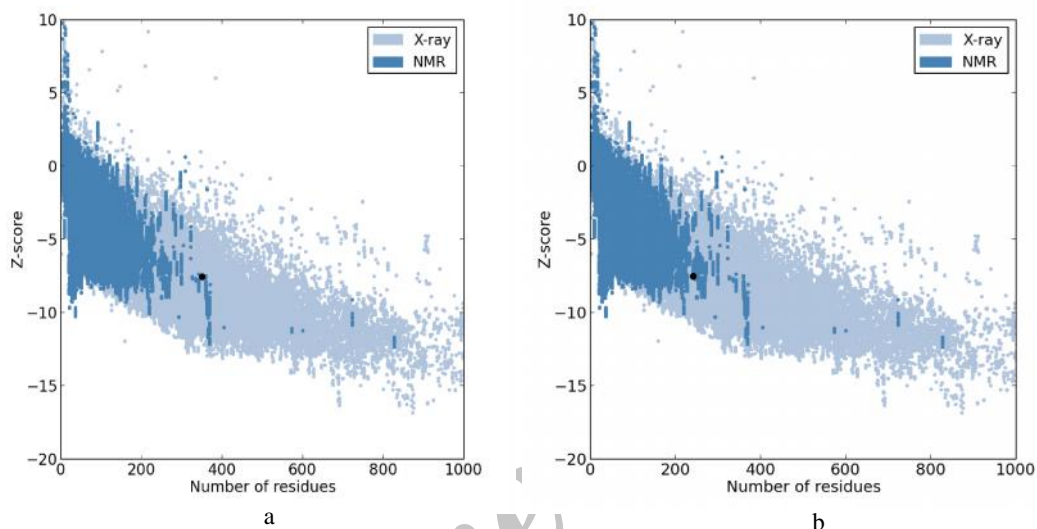
اجازه داده شده اضافی و نواحی سخاوتمندانه اجازه داده شده را به صورت زیر مجموعه‌ای از نواحی اجازه داده نشده نمودار دسته‌بندی می‌نماید (جدول ۱ و شکل‌های ۴ و ۵). راستی آزمایی ساختار سه بعدی نشان داد در گیرنده‌های EcR کرم غوزه و بالتوری ترتیب ۸۱/۴۲٪ و ۷۸/۸۶٪ از ریشه‌ها یک نمره بزرگ‌تر از ۰/۲ بوده و برای یک مدل کیفی وضعیت مناسب داشتند.

بررسی نتایج غربال‌گری مجازی برهمکنش گیرنده‌ی اکتیزونی-فیتواکدایستروئیدی توسط داکینگ

همان‌طور که در مواد و روش‌ها اشاره شد از روش غربال‌گری مجازی، برای انتخاب بهترین استروئید گیاهی متصل شونده به گیرنده‌ی اکتیزون *H. armigera* از بین استروئیدهای گیاهی مختلف مندرج در جدول (۱) استفاده شد. در نتایج حاصل از داکینگ برای هر کمپلکس گیرنده‌ی متصل به استروئید گیاهی، ۱۰۰ حالت اتصال در جایگاه‌های فعال ممکن بررسی شد. در این مرحله برای پیش‌بینی و انتخاب محتمل‌ترین حالت ممکن از پارامترهای خروجی داکینگ بهره گرفته شد. این پارامترهای مهم و تأثیرگذار شامل پرتکرارترین کنفورماسیون (بیشترین تکرار در ۱۰۰ حالت ممکن)، پایین‌ترین یا منفی‌ترین انرژی پیوند گیرنده‌ی-لیگاند (هرچقدر انرژی منفی بیشتر احتمال تشکیل پیوند قوی‌تر)، ثابت بازدارنده لیگاند، تعداد باندهای هیدروژنی شکل گرفته در محل اتصال و در آخر میزان تغییرات شکل فضایی اکدایستروئید در هنگام اتصال به EcR مربوطه می‌باشد. ثابت مهارکنندگی یا بازدارنده (k_i) (inhibitory constant) به طور خلاصه نشان دهنده‌ی توانایی بازدارندگی یک لیگاند است. این توان بازدارنده معادل غلظتی از لیگاند است که حداکثر ۵۰ درصد از کارایی یک گیرنده را مختل کند (Allert et al., 2004) این تعریف مشابه LC50 در مباحث سم‌شناسی می‌باشد. پرواضح است هرچه لیگاند مناسب‌تر و قوی‌تر باشد در دوزهای بسیار کم، توان بازدارندگی خواهد داشت. میزان تغییرات شکل فضایی لیگاند در هنگام اتصال توسط آنالیز ریشه‌ی دوم انحراف معیار (RMSD) (Root-mean-square deviation)

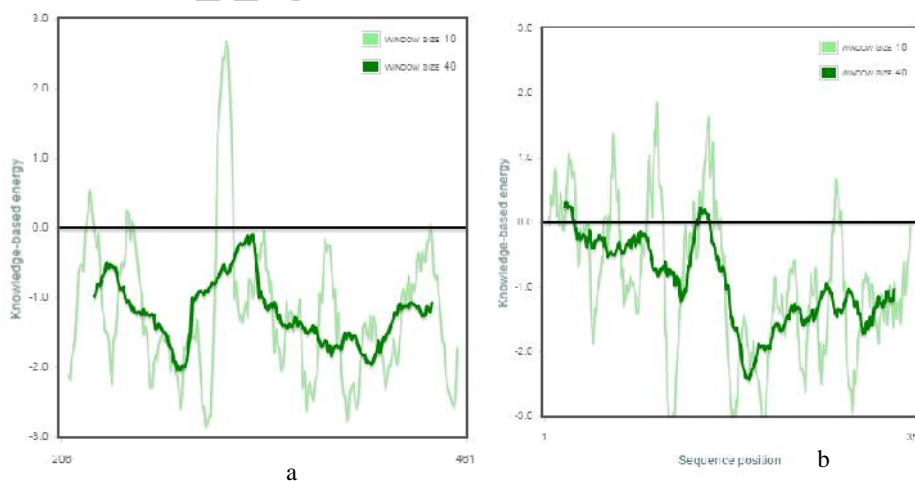
شده، استروئیدهای فوق‌الذکر اثر بسیار کمی در اتصال به مدل EcR بالتوری در مقایسه با مدل EcR متعلق به کرم غوزه داشتند. بنابراین می‌توان گفت استروئیدهای غربال شده از توان باند شدن و اتصال به گیرنده‌ی اکدیژونی *H. armigera* به‌صورت اختصاصی برخوردار می‌باشند (جدول ۴).

زیادی با جایگاه فعال دو استروئید مرجع (E20 و P1A) داشتند (جدول ۳). اما مهم‌ترین پرسش این است که آیا استروئیدهای گیاهی فوق‌الذکر اختصاصی عمل می‌نمایند. برای پاسخ به این سوال، گیرنده‌ی اکدیژون بالتوری نیز به‌صورت همولوژی مدل ساخته و با همان شرایط بر همکنش آن با استروئیدهای گیاهی مؤثر بر کرم غوزه مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در جدول (۴) نشان داده

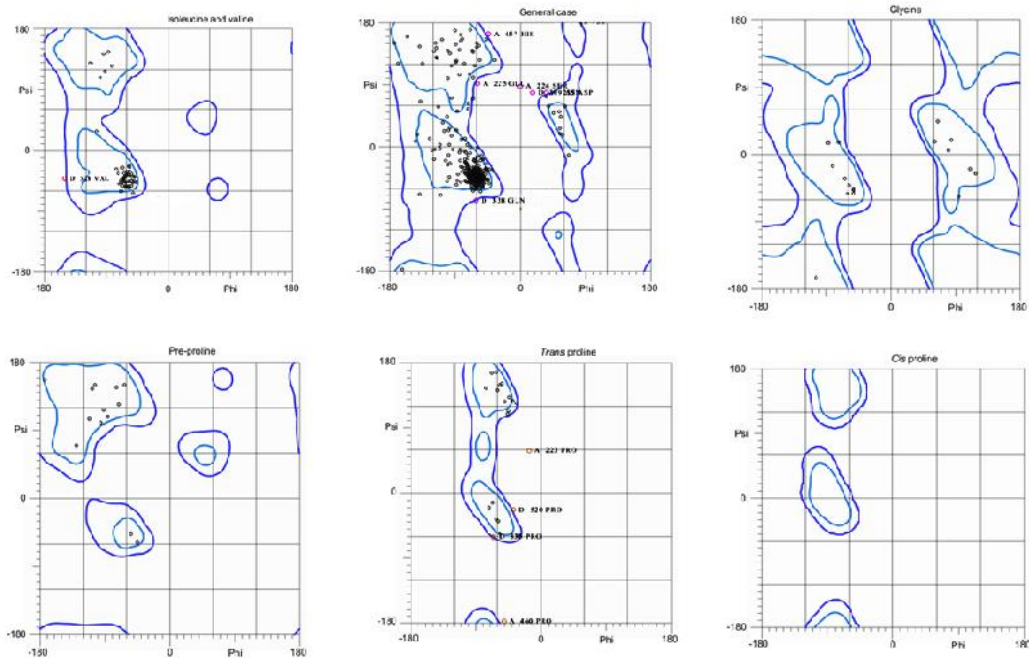


شکل ۲- شاخص Z نشان دهنده‌ی کیفیت کلی مدل است. اندازه‌ی این شاخص (نقطه‌ی سیاه در نمودار) در گیرنده‌ی اکدیژونی کرم غوزه، (a) *Helicoverpa armigera* و بالتوری سبز، (b) *Chrysoperla carnea*.

Fig. 2. The Z-score indicates overall model quality. The Z-score (black plot) for EcR of (a) *Helicoverpa armigera* and (b) *Chrysoperla carnea*.

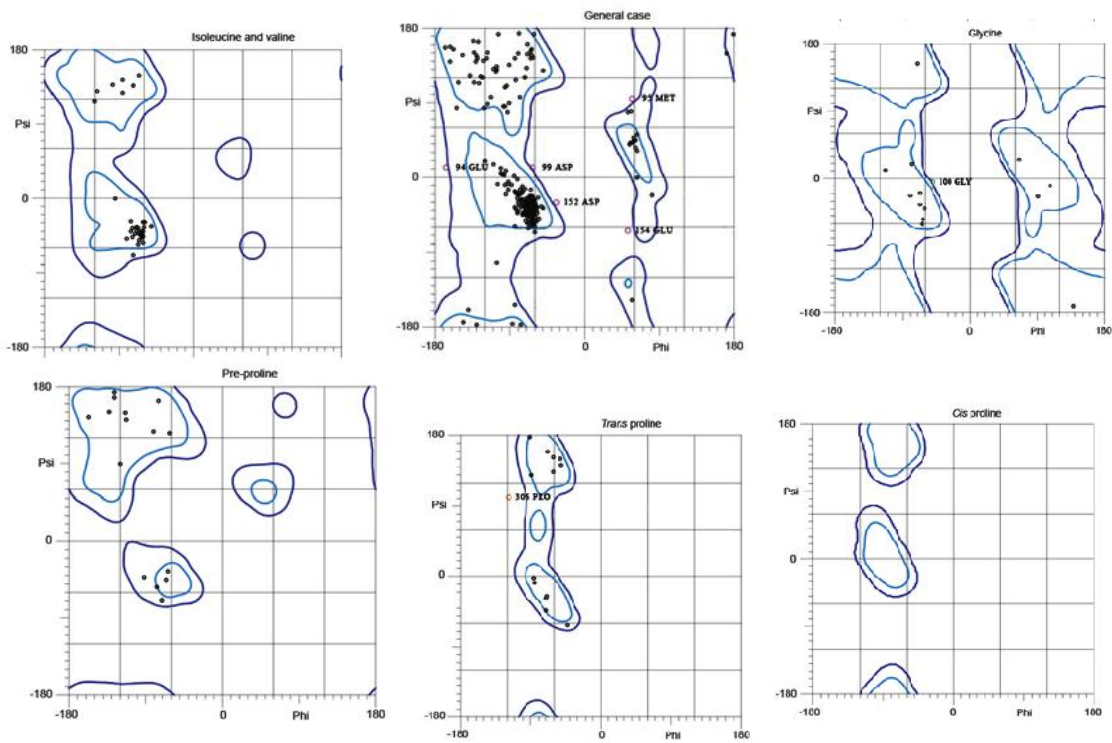


شکل ۳- نمودار انرژی در ساختار ثانویه به‌عنوان تابعی از موقعیت هر اسید آمینه در توالی ساختارهای کرم غوزه (a) و بالتوری سبز (b).
Fig. 3. Plotting energies as a function of amino acid sequence position in secondary structure of (a) *Helicoverpa armigera* and (b) *Chrysoperla carnea*.



شکل ۴- نمودار راماجاندران EcR کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* به منظور ارزیابی هندسی.

Fig. 4. Ramachandran plot of *Helicoverpa armigera* EcR for geometrical assessment.



شکل ۵- نمودار راماجاندران EcR بالتوری سبز، *Chrysoperla carnea* به منظور ارزیابی هندسی.

Fig. 4. Ramachandran plot of *Chrysoperla carnea* EcR for geometrical assessment.

جدول ۱- ارزیابی مدل پیش‌بینی شده گیرنده‌ی اکدیژونی (EcR) در کرم غوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera* و بالتوری سبزه، *Chrysoperla carnea*.

Table 1. Assessing predicted model of EcR of *Helicoverpa armigera* and *Chrysoperla carnea*.

		EcR of <i>H. armigera</i>		EcR of <i>C. carnea</i>		
Protein Geometry	Poor rotamers	8	2.1%	5	1.59%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	360	95.23%	297	94.59%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	11	2.30%	7	2.72%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	451	97.61%	320	96.26%	Goal: >98%
	C deviation > 0.25Å	1	0.23%	9	2.67%	Goal: 0
	Bad bonds:	0 / 3745	0.00%	13 / 2888	0.45%	Goal: 0%
	Bad angles:	1 / 5075	0.02%	61 / 3889	1.57%	Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 22	0.00%	0 / 16	0.00%	Expected: 1 per chain or 5%
Low-resolution Criteria	CaBLAM outliers	5	1.12%	14	4.03%	Goal: <1.0%
	CA Geometry outliers	3	0.67%	11	3.17%	Goal: <0.5%

جدول ۲- نتایج داکینگ، پارامترهای غربال‌گری در تعیین فیتوآکدایستروئیدهای مناسب در اتصال به گیرنده‌ی اکدیژونی (EcR) کرم غوزه‌ی پنبه، *Helicoverpa armigera*.

Table 2. Docking results, the parameters screening suitable phytoecdysteroids to bind EcR receptors of *Helicoverpa armigera*.

Phytoecdysteroids	Energy binding (kcal/mol)	RMSD (Å)	Ki (µM)	Active site	Hbonds (no.)
11 -Hydroxy-20-DeoxyShidasterone	-25.2393	37.574 96	121.12	Glu B309; Arg B383; Met B380; Thr B346; Ala B398	5
2,3,14,20,24-PentaHydroxy-6,26-Dioxo-Stigmast-7-Ene-22,26-Olide	0.2820	37.927 0	5.1 mM	Asn B504; Arg B383; Arg B387; Ala B398	4
2,3,14,20,26-PentaHydroxy-6-Oxo-Stigmast-7-Ene-22,26-Lactol	-27.3588	38.037	91.44	Asn B504; Tyr B408; Arg B383; Glu B309; Ala B398	5
2,3,14,20-TetraHydroxy-26-Methoxy-6-OXO-Stigmast-7-Ene-22,26-Lactol	-13.8773	41.45	723.31	Tyr B408; Ala B398; Glu B309; Arg B383	4
21-HydroxyShidasterone	16.904	70.49	7.5 mM	Thr B343; Ala B398; Glu B309; Arg B387	5
24-Hydroxyecdysone 2,3-Acetonide	14.3251	81.76	6.81 mM	Glu B306	1
AervEcdysteroid A	-10.2901	52.11	241.43	Ala B398; Glu B309; Arg B387	3
AervEcdysteroid B	-13.8605	43.91	198.29	Arg B383; Glu B309; Ala B398	3
AervEcdysteroid C	2.3385	80.12	1.23 mM	Tyr B408	1
AervEcdysteroid D	6.7036	69.15	2.11 mM	Arg B383; Glu B309; Tyr B408; Ala B398	5
CallEcdysterol A	-20.9118	30.43	141.22	Met B380; Arg B383; Glu B309; Ala B398	4
CallEcdysterol B	-22.999	38.06	133.54	Glu B309; Arg B387; Ala B398	5
CallEcdysterol C	-19.3950	32.33	110.64	Arg B387; Glu B309; Thr B343	3
E20	-27.9898	31.78	25.51	Tyr B408; Arg B383; Thr B346; Glu B309; Ala B398	6
GlutinOsterone	-16.7213	34.7	174.6	Asn B504; Tyr B408; Arg B387; Arg B383; Glu B309; Ala B398; Thr B346	7
P1A	-32.3532	34.9	30.5	Tyr B408; Thr B346; Arg B383; Glu B309; Ala B398	6
PonaSteoside B	59.4725	56.22	12.3mM	Asn B504; Glu B309; Met B342; Thr B346; Tyr B408	5
SeptanoEcdysone	54.5993	65.33	11.54 mM	Thr B343; Arg B383; Glu B309; Arg B387; Ala B398	6

جدول ۳- مقایسه‌ی هم پوشانی جایگاه فعال فیتواکدایستروئیدها منتخب با استروئیدهای مرجع E20 و P1A.

Table 3. Comparing active site overlapping between selected phytoecdysteroids and reference steroids (E20 and P1A).

Phytoecdysteroids	E20	P1A
11 -Hydroxy-20-DeoxyShidasterone	Glu B309; Arg B383; Thr B346; Ala B398	Glu B309; Arg B383; Thr B346; Ala B398
2,3,14,20,24-PentaHydroxy-6,26-Dioxo-Stigmast-7-Ene-22,26-Olide	Arg B383; Ala B398	Arg B383; Ala B398
2,3,14,20,26-PentaHydroxy-6-Oxo-Stigmast-7-Ene-22,26-Lactol	Tyr B408; Arg B383; Glu B309; Ala B398	Tyr B408; Arg B383; Glu B309; Ala B398
2,3,14,20-TetraHydroxy-26-Methoxy-6-OXO-Stigmast-7-Ene-22,26-Lactol	Tyr B408; Ala B398; Glu B309; Arg B383	Tyr B408; Ala B398; Glu B309; Arg B383
21-HydroxyShidasterone	Ala B398; Glu B309	Ala B398; Glu B309
24-Hydroxyecdysone 2,3-Acetonide	---	---
AervEcdysteroid A	Ala B398; Glu B309;	Ala B398; Glu B309;
AervEcdysteroid B	Arg B383; Glu B309; Ala B398	Arg B383; Glu B309; Ala B398
AervEcdysteroid C	Tyr B408	Tyr B408
AervEcdysteroid D	Arg B383; Glu B309; Tyr B408, Ala B398	Arg B383; Glu B309; Tyr B408, Ala B398
CallEcdysterol A	Arg B383; Glu B309; Ala B398	Arg B383; Glu B309; Ala B398
CallEcdysterol B	Glu B309; Ala B398	Glu B309; Ala B398
CallEcdysterol C	Glu B309;	Glu B309;
GlutinOsterone	Tyr B408; Arg B383; Glu B309; Ala B398; Thr B346	Tyr B408; Arg B383; Glu B309; Ala B398; Thr B346
PonaSteoside B	Glu B309; Thr B346, Tyr B408	Glu B309; Thr B346, Tyr B408
SeptanoEcdysone	Arg B383; Glu B309; Ala B398	Arg B383; Glu B309; Ala B398

جدول ۴- بررسی اتصال غیر مؤثر فیتواکدایستروئیدهای منتخب با گیرنده‌ی اکدیژونی (EcR) بالتوری سبز *Chrysoperla carnea*.

Table 4. Non-effective binding screened selected phytoecdysteroids by EcR of *Chrysoperla carnea*.

phytoecdysteroids	Energy binding (kcal/mol)	RMSD (Å)	Ki (µM)	active site	Hbonds (no.)
11 -Hydroxy-20-DeoxyShidasterone	-3.93	54.74	421.32	Arg A230; Glu A276	2
2,3,14,20,26-PentaHydroxy-6-Oxo-Stigmast-7-Ene-22,26-Lactol	-7.36	48.39	391.44	Tyr A262; Ala A567	2
CallEcdysterol A	-5.18	42.83	341.62	Glu A279	1
CallEcdysterol B	-4.59	35.86	453.54	Thr A309; Arg A487	2
CallEcdysterol C	-4.95	52.31	510.44	Asn A456; Ser 512	2
GlutinOsterone	-6.23	64.22	474.16	Arg A303	1

نتیجه گیری

خطاهایی وجود دارد بنابراین پیشنهاد می شود نتایج مشکوک مدل حتماً به‌بوته آزمایش‌های عملی گذاشته شود. در این پژوهش استروئیدهای گیاهی منتخب برهمکنش مناسب و قابل مقایسه با مهارکننده‌ی اصلی خود یعنی E20 و نمونه‌ی دیگر رفرنس P1A داشت. پیشنهاد می شود ترکیبات مذکور ساخته شده و آزمایش‌های اثربخشی روی گیرنده‌های اکدیژونی انجام شود.

روش‌های مدل‌سازی علاوه بر سهولت انجام و ارزان بودن، به‌پژوهشگر پیش از شروع آزمایش‌ها با مواد گران‌بها این دیدگاه را می‌دهد که مسیر آزمایش کجا است. آیا ترکیب یا سمی را که می‌خواهد به‌منظور مهار آنزیم، گیرنده‌ی آنزیم یا گیرنده‌ی هورمونی در آفت مورد نظر به کار ببرد، اصولاً براساس قوانین موجود مولکولی این توانایی را دارد یا خیر. همین جواب اگر منفی باشد در صورتی که مراحل مدل‌سازی دقیق و صحیح انجام پذیرفته باشد، آزمایش عملی غیرموجه است. البته در هر مدل

سپاس‌گزاری

مراحل پژوهش و آموزش نرم افزارها با اینجانب همکاری داشته‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

بدین وسیله از زحمات دکتر حاجی‌زاده از دانشکده داروسازی فردوسی مشهد و آقای دکتر محمدرضا کلانی‌نیا از دانشکده علوم پزشکی فردوسی مشهد که در انجام

References

- Acton, Q.A. 2011. Pesticides: Advances in Research and Application: 2011 Edition. Scholarly Editions. pp. 297.
- Ahmad, M. 2007. Insecticide resistance mechanisms and their management in *Helicoverpa armigera* (Hubner): a review. *Journal of Agricultural Research*, 45 (4): 319-335.
- Albuquerque, G.S., Tauber, C.A. & Tauber, M.J. 1994. *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Life History and Potential for Biological Control in Central and South America. *Biological Control*, 4(1): 8-13.
- Allert, M., Rizk, S.S., Looger, L.L. & Hellinga, H.W. 2004. Computational design of receptors for an organophosphate surrogate of the nerve agent soman. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA*. 101: 7907-7912.
- Benkert, P., Biasini, M. & Schwede, T. 2011. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics Advance Access*, 27 (3): 343-350.
- Billas, I.M., Iwema, T., Garnier, J.M., Mitschler, A., Rochel, N. & Moras, D. 2003. Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor. *Nature*, 426(6962): 91-96.
- Billas, I.M. & Moras, D. 2005. Ligand-binding pocket of the ecdysone receptor. *Vitamins and Hormones*, 73: 101-29.
- Billas, I.M.L., Browning, C., Lawrence, M.C., Graham, L.D., Moras, D. & Hill, R. 2009. The structure and function of ecdysone receptor. pp. 335-360. In: Smaghe, G. (ed.), *Ecdysone: structures and functions*. Springer, Berlin.
- Carmichael, J.A., Lawrence, M.C., Graham, L.D., Pilling, P.A., Epa, V.C., Noyce, L., Lovrecz, G., Winkler, D.A., Pawlak-Skrzecz, A., Eaton, R.E., Hannan, G.N. & Hill, R.J. 2005. The X-ray structure of a hemipteran ecdysone receptor ligand-binding domain: comparison with a lepidopteran ecdysone receptor ligand-binding domain and implications for insecticide design. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(23): 22258-22269.
- Dhadialla, T.S., Carlson, G.R. & Le, D.P. 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Entomology*, 43: 545-69.
- Dhadialla, T.S., Retnakaran, A. & Smaghe, G. 2005. Insect growth and development-disrupting insecticides. pp. 55-115. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K. & Gill, S.S. (eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier Press, Oxford.
- Dinan, L. 2001. Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry*, 57(3): 325-339.
- Dinan, L., Savchenko, T. & Whiting, P. 2001. On the distribution of phytoecdysteroids in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58 (8): 1121-1132.
- Eisenberg, D., Lüthy, R., & Bowie, J.U. 1997. VERIFY3D: assessment of protein models with three dimensional profiles". *Methods Enzymology*, 277: 396-404.

- Fahrbach, S.E., Smaghe, G. & Velarde, R.A. 2012. Insect nuclear receptors. Annual Review of Entomology, 57: 83-106.
- Farid, A. 1986. Study of bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) on tomato in Jiroft and Kahnuj. Applied Entomology and Phytopathology, 54: 12-24.
- Fathipour, Y. & Naseri, B. 2011. Soybean cultivars affecting performance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). pp.599-630. In: Ng, T.B. (ed.) Soybean Biochemistry, Chemistry and Physiology. Rijeka: InTech.
- Ghadari, R. 2012. Practical Computational Chemistry Docking & MD Simulation. Parivar. Tabriz. pp. 126. (In Persian).
- Ghosh, D. & Laddha, K.S. 2006. Extraction and monitoring of phytoecdysteroids through HPLC. Journal of Chromatographic Science, 44 (1): 22-26.
- Giolo, F., Medina, P., Grützmacher, A. & Viñuela, E. 2009. Effects of pesticides commonly used in peach orchards in Brazil on predatory lacewing *Chrysoperla carnea* under laboratory conditions. BioControl, 54(5): 625-635.
- Godoy, M.S., Carvalho, G.A., Moraes, J.C., Cosme, L.V., Goussain, M.M., Carvalho, C.F. & Morais, A.A. 2004. Selectivity of six insecticides used in citrus crops on pupae and adults of *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). Neotropical Entomology, 33: 359-364.
- Graham, L.D., Johnson, W.M., Pawlak-Skrzecz, A., Eaton, R.E., Bliese, M., Howell, L., Hannan, G.N. & Hill, R.J. 2007. Ligand binding by recombinant domains from insect ecdysone receptors. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 37(6): 611-26.
- Guex, N., & Peitsch, M.C. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis, 18: 2714-2723.
- Kuhr, R.J. & Motoyama, N. 1998. Pesticides and the Future: Minimizing Chronic Exposure of Humans and the Environment. IOS Press. Amsterdam.
- 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.
- Medina, P., Budia, F., Tirry, L., Smaghe, G. & Viñuela, E. 2001. Compatibility of Spinosad, Tebufenozide and Azadirachtin with Eggs and Pupae of the Predator *Chrysoperla carnea* (Stephens) Under Laboratory Conditions. Biocontrol Science and Technology, 11(5): 597-610.
- Medina, P., Smaghe, G., Budia, F., Del Estal, P., Tirry, L. & Viñuela, E. 2002. Significance of penetration, excretion, and transovarial uptake to toxicity of three insect growth regulators in predatory lacewing adults. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 51(2): 91-101.
- Medina, P., Smaghe, G., Budia, F., Tirry, L. & Viñuela, E. 2003. Toxicity and absorption of azadirachtin, diflubenzuron, pyriproxyfen, and tebufenozide after topical application in predatory larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Environmental Entomology, 32(1): 196-203.
- Mojeni, T.D., Bayat Asadi, H. & Noori, G. 2000. Identification of bollworm species and determination the percentage of abundance on important hosts of Golestan province. Proceedings of the 14th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan University of Technology. 5-8 Sept. (In Persian with English summary).

- Mojeni, T.D., Bayat Asadi, H., Noori, G. & Shojaei, M. 2005. Study on bioregional aspects of bollworm *Helicoverpa armigera* (Hub.) (Lepidoptera: Noctuidae), in the cotton fields of Golestan province Agriculture Science, 11 (2): 97-115. (In Persian with English summary).
- 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.
- Mommaerts, V., Sterk, G. & Smaghe, G. 2006. Bumblebees can be used in combination with juvenile hormone analogues and ecdysone agonists. Ecotoxicology (London, England), 15(6): 513-521.
- Moras, D. & Gronemeyer, H. 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. Current Opinion in Cell Biology, 10(3): 384-391.
- Nakagawa, Y. 2005. Nonsteroidal ecdysone agonists. Vitamins and Hormones, 73: 131-173.
- Nakagawa, Y. & Henrich, V.C. 2009. Arthropod nuclear receptors and their role in molting. The FEBS Journal, 276(21): 6128-6157.
- Naseri, B., Fathipour, Y., Moharrampour, S. & Hosseiniaveh, V. 2009. Life table parameters of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on different soybean cultivars. Journal of Entomological Society of Iran, 29: 25-40. (In Persian with English summary).
- Pimentel, D. 2002. Encyclopedia of Pest Management. Marcel Dekker, INC. New York. Basel, pp. 933.
- Ramachandran, G.N., Ramachandran, C. & Sasisekharan, V. 1963. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. Journal of Molecular Biology, 7: 95-99.
- 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.
- Retnakaran, A., Krell, P., Feng, Q. & Arif, B. 2003. Ecdysone agonists: mechanism and importance in controlling insect pests of agriculture and forestry. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 54(4): 187-199.
- Schmelz, E.A., Grebenok, R.J., Ohnmeiss, T.E. & Bowers, W.S. 2002. Interactions between *Spinacia oleracea* and *Bradysia impatiens*: a role for phytoecdysteroids. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 51 (4): 204-221.
- Senior, L.J. & McEwen, P.K. 2001. The use of lacewings in biological control. Lacewings in the crop environment. (ed. McEwan, P.K., New, T.R. & Whittington, A.E.), pp. 296-302. Cambridge University Press, Cambridge.
- Vogt, H. 1994. Effects of pesticides on *Chrysoperla carnea* Steph. (Neuroptera: Chrysopidae) in the field and comparison with laboratory and semi-field results. IOBC/WPRS Bull 17: 71-82.
- Wing, K.D., Slaweki, R.A. & Carlson, G.R. 1988. RH 5849, a nonsteroidal ecdysone agonist: effects on larval Lepidoptera. Science, 241(4864): 470-472.
- Wiederstein, M., & Sippl, M.J. 2007. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic Acids Research, 35: W407-W410.
- Yao, T.P., Forman, B.M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J.D., McKeown, M., Cherbas, P. & Evans, R.M. 1993. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. Nature, 366(6454): 476-479.
- Yong, L., Lambert, M.H. & Xu, H.E. 2003. Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. Structure, 11: 714-746.

- Young, D.C. 2009. Computational Drug Design: A Guide for Computational and Medicinal Chemists. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.
- 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.
- Zotti, M.J., Christiaens, O., Rouge, P., Grutzmacher, A.D., Zimmer, P.D. & Smagghe, G. 2012. Sequencing and structural homology modeling of the ecdysone receptor in two chrysopids used in biological control of pest insects. Ecotoxicology, 21(3): 906-918.

Archive of SID

Archive of SID

Feasibility study on the use of several phytoecdysteroids as biopesticides via evaluation of their interaction models with Ecdysone receptors of *Helicoverpa armigera* and *Chrysoperla carnea*

Arezo Heydarzade, Orouj Valizadegan, Mahmood Jokar

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Uromia University, Uromia, Iran
Corresponding author: Arezoo Heydarzade, email: arezoo.heydarzade@gmail.com

Received: Dec., 07, 2015

4 (2) 55-70

Accepted: Oct., 31, 2016

Abstract

Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) is one of the important pests of cotton in the world and Iran with wide host range and causes an irrecoverable damage in the agricultural system. In the past decades, researchers have been searching for a new technology to produce safe pesticides with the properties such as selective effects on target pests and less risk on non-target organisms and the environment. One of the most popular pesticides is disruptive molting (IGRs) which has been used widespread in the fields. The aim of this study was to evaluate the interactions between some phytoecdysteroids which submitted in data base, during 2013-2015, and Ecdysone receptors in order to control *H. armigera* with less adverse effects on *Chrysoperla carnea* as a natural enemy by molecular docking. Ecdysone receptor models of *H. armigera* and *C. carnea* were designed and their efficacies were estimated. According to the Z-score index, qualities of EcR receptors made for *H. armigera* and *C. carnea* were equivalent to NMR and X-ray crystallography methods, respectively. Results showed that among tested phytoecdysteroids, 11-Hydroxy-20-Deoxyshidasterone; 2, 3, 14, 20, 26-PentaHydroxy-6-OXO-Stigmast-7-ENE-22.26-Lactol; Calledysterol A, B, C and Glutinosterone had the minimum inhibition constant (K_i), the most negative bonding energy and the minimum changes in RMSD in binding to target pest ecdysone receptor. In conclusion, the mentioned phytoecdysteroids, have a potential to control *H. armigera* with less side effects on *C. carnea* life cycle.

Keywords: molecular docking, *Helicoverpa armigera*, EcR, homology model