بررسی اثر آنزیم کلسترول اکسیداز در تخم‌ریزی و استقرار لارو شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی، *Tuta absoluta*، روی سه رقم گوجه‌فرنگی

سمانه سلیمی* و غلام‌حسین قرخانی

دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، آذربایجان‌شرقی، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۵

چکیده:

شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی *Tuta absoluta* (Meyrick) یکی از آفات کلیدی و خطرناک گیاهان تیره بادمجانیان در دنیا و ایران است که برای کنترل آن از حشره‌کش‌های مختلفی استفاده می‌شود. استفاده بیش از حد از حشره‌کش‌های شیمیایی به‌سرعت منجر به بروز مقاومت آفت می‌شود. استفاده از ترکیباتی با منشاء پروتئینی مانند آنزیم کلسترول اکسیداز جایگزین مناسبی برای حشره‌کش‌های شیمیایی محسوب می‌شوند. در تحقیق حاضر، اثر آنزیم کلسترول اکسیداز روی ترجیح تخم‌ریزی، استقرار لاروها و وزن شفیره‌های شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. سه رقم گوجه‌فرنگی نیوتن، ازمیر و ارگون طی سه مرحله فنولوژی ۳۰ و ۴۵ و ۶۰ روزگی تحت تیمار آنزیم کلسترول اکسیداز در غلظت‌های ۰/۰۸ ، ۰/۲ و ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر قرار گرفتند. آزمایش در ۵ تکرار، رطوبت نسبی ۱۰±۶۰ درصد و دمای ۸ ± ۲۵ درجه سیلسیوس در شرایط گلخانه‌ای صورت گرفت. نتایج نشان داد با افزایش غلظت آنزیم، تخم‌ریزی افراد ماده، استقرار لاروهای نئونات و وزن شفیره‌های نر و ماده کاهش یافت. بیش‌ترین میزان تخم گذاشته‌شده در روی رقم ارگون در غلظت ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر، در مرحله ۶۰ روزگی گیاه میزبان و کم‌ترین تعداد تخم گذاشته‌شده رویرقم ازمیر در غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر و در مرحله ۳۰ روزگی گیاه میزبان ثبت گردید. بیش‌ترین استقرار لارو در روی رقم‌های نیوتن و ارگون در غلظت ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر و کم‌ترین میزان استقرار روی رقم ازمیر در غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر ثبت گردید. نتایج نشان داد که آنزیم کلسترول اکسیداز توانایی کنترل و دورکنندگی برای شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی دارد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم کلسترول اکسیداز، شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی، گوجه‌فرنگی ،مدیریت تلفیقی آفات.

* **مسئول مکاتبات: سمانه سلیمی،** salimisamaneh70@gmail.com

مقدمه:

مینوز برگ گوجه‌فرنگی، *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae)، آفت بومی آمریکای جنوبی است که روی محصولات گوجه‌فرنگی خسارت قابل توجهی ایجاد می‌کند و برای اولین بار در اروپا در اواخر سال ۲۰۰۶ شناسایی شد. در ایران طی سال‌های گذشته به عنوان آفت قرنطینه‌ای به حساب می‌آمد ولی در دی ماه ۱۳۸۹ از ترکیه وارد کشور شد و امروزه در بیشتر مناطق ایران انتشار یافته است (Baniameri and Cheraghian, 2011). این آفت به طور عمده به برگ‌ها و میوه‌ها خسارت می‌زند اما می‌تواند روی ساقه، جوانه‌ها و گل‌ها نیز خسارت وارد کرده و سبب از دست‌رفتن محصول تا صد در صد شود (Estay, 2000). خسارت مستقیم آفت منجر به کاهش ظرفیت فتوسنتز و سطح تولید شده و در خسارت غیرمستقیم عوامل بیمارگر باعث آلودگی ثانویه می‌شود (Garzia *et al.*, 2011). کنترل شب‌پره‌ی مینوز گوجه‌فرنگی به‌ویژه در مزارع کشت گوجه‌فرنگی دشوار است. یکی از ابزارهای اصلی مدیریت این آفت استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی است. ولی اتکای بیش از حد به حشره‌کش‌های شیمیایی به سرعت منجر به بروز مقاومت به آفت‌کش‌ها می‌شود امروزه محققین فعالیت‌های خود را برای یافتن منابع جدیدی از حشره‌کش‌ها متمرکز نموده‌اند که علاوه بر سازگاری با محیط‌زیست دارای اثرات کنترلی موثر نیز باشند. کشف پروتئین‌های حشره‌کش یک روش مهم در کنترل آفات و توسعه گیاهان تراریخت است. تاکنون بیان ژن پروتئین‌های استخراج شده از باکتری باسیلیوس تورینجنسیس، *Bacillus thuringiensis*، توانسته‌اند تا حدودی در کنترل آفات موثر واقع شوند ولی گاهی در مورد بعضی آفات موفق عمل نکرده یا کارآیی موثری نداشته‌اند (Franco *et al.*, 2002). سایر پروتئین‌های دارای خاصیت حشره‌کشی از قبیل لکتین‌ها، بازدارنده‌های آلفا-آمیلاز، بازدارنده‌های پروتئاز و غیره می‌توانند در توسعه و نشو و نمای حشرات هدف اختلال ایجاد کنند. (Franco *et al.*, 2002). لاروهای شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی برای هضم مواد غذایی مورد استفاده‌ی خود که شامل برگ، میوه، ساقه، گل و میوه است نیازمند آنزیم‌های مختلف گوارشی هستند و بنابراین این آنزیم‌ها نیز می‌توانند هدف مناسبی برای بسیاری از مهارکننده‌های آنزیمی قرار گیرند تا با از کار افتادن آن‌ها تغذیه حشره مختل و به مرگ آن منجر شود (Gatehouse and Gatehouse, 1998). طی سال ۲۰۰۴ از آنزیم اسکوربات اکسیداز علیه کرم ساقه‌خوار ذرت، *Helicoverpa zea* Boddi، استفاده شد و ظرفیت بالای این آنزیم در کنترل آفات اثبات گردید (Wenming *et al.*, 2004). سال ۲۰۰۳ از آنزیم کیتیناز علیه لاروهای سن دوم *Sesamia certica* Lederer استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت بیشترین میزان مرگ و میر گزارش شد (Osman *et al.*, 2003). آنزیم کلسترول اکسیداز نماینده گروه جدیدی از پروتئین‌های حشره‌کش است که در سال‌های اخیر از سوی فعالان این بخش مورد توجه قرار گرفته است (Pollegioni *et al.*, 2009). آنزیم کلسترول اکسیداز یا به طور کامل *3β-hydroxysterol oxidase* یک پودر لیوفیلیزه زرد رنگ است و در بسترهای آبگریز فعال است و حلالیت آن به وسیله شوینده‌ها افزایش می‌یابد. این آنزیم از اکسیده شدن کلسترول تولید و به وسیله دو واکنش کاتالیز می‌شود (Purcell *et al.*, 1993):

۱) اکسیده شدن گروه C_3-OH و تولید Cholest-5-en-3One و ۲) ایزومره شدن و تولید Cholest-4-en-3One.

برای اولین بار در سال ۱۹۹۳ در طی یک غربالگری تصادفی کلسترول اکسیداز به عنوان یک پروتئین حشره‌کش با اثر بالا در روی لاروهای کرم غوزه پنبه شناسایی شد (Purcell *et al.*, 1993) برای اولین بار از

باکتری *Rhodococcus erythropolis* استخراج شد. در سال ۲۰۰۰ لیستی از میکروارگانیسم‌هایی که تولید کلسترول اکسیداز می‌کنند منتشر شد باکترهایی مانند *Arthrobactera, Rhodococus equi, Nocardia erythropolis* تولید کلسترول اکسیداز درون سلولی و *Sterptomyces violascens, Pseudomonas, Schizophllum commune* کلسترول اکسیداز را به صورت خارج سلولی تولید می‌کنند (MacLachlan *et al.*, 2000). آنزیم کلسترول اکسیداز روی تراوائی لایه پلاسمایی تخم‌ها اثر می‌گذارد و بافت سلولی تخم را تجزیه کرده و باعث کاهش ظهور لاروهای نئونات می‌شود. همچنین مولکول‌های کلسترول اکسیداز در پوسته تخم نفوذ می‌کنند و روی بقا و تکامل لاروها اثر می‌گذارد و لاروهای ظهور کرده از نظر تکامل عقب افتاده بوده و پویایی کمی دارند (Lange, 1992). بر اساس مطالعات صورت گرفته حشرات کاملی که طی دوره‌ی جفت‌گیری و پیش از تخم‌گذاری از این آنزیم در رژیم غذایی خود تغذیه کرده بودند میزان تخم‌ریزی در آن‌ها ۸۳ درصد، همچنین بقا لاروها به میزان ۷۳ درصد کاهش یافته بود (Greenplate *et al.*, 1994). طبق تحقیقاتی بافت‌های گیاهی تراریخته‌ای که در آن‌ها آنزیم کلسترول اکسیداز بیان شده در برابر لاروهای کرم غوزه پنبه فعالیت ضد حشره‌کشی داشته‌اند (Pollegioni *et al.*, 2009). طی پژوهش حاضر به منظور بررسی امکان استفاده از این آنزیم در مدیریت شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی اثر آنزیم کلسترول اکسیداز برترجیح تخم‌ریزی و میزان استقرار لاروهای شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی روی گیاه میزبان و تاثیر آن روی القا مکانیسم‌های آنتی بیوز[1] و آنتی زنوز[2] در گیاه و حشره مورد مطالعه، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها:

پرورش شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی

برای پرورش حشرات و ایجاد کلنی آزمایشگاهی، برگ‌ها و میوه‌های آلوده به مراحل مختلف تخم، لارو، شفیره و حشرات کامل آفت از گلخانه بدون سابقه سم‌پاشی طی فصل واقع در شهرستان خسرو شهر در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری و در داخل ظرف‌های پلاستیکی به ابعاد ۱۰×۲۲×۳۲ سانتی‌متر قرار داده و درب ظرف‌ها با توری با مش ۲ میلیمتر پوشیده شد و در انسکتاریوم در دمای ۸±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰±۶۵ درصد و دوره‌ی روشنایی، تاریکی ۸:۱۶ نگهداری شده و در صورت نیاز به برگ جهت تغذیه لاروها، برگ جدید به داخل ظرف انتقال یافت. حشرات کامل از کلنی صحرایی به طور تدریجی ظهور کرده برای تخم‌ریزی به ظروف استوانه‌ای به ابعاد (ارتفاع:۱۱، قطر: ۱۱) سانتی‌متر حاوی چند برگ تازه گوجه‌فرنگی رقم ازمیر منتقل شد و انتهای برگ‌ها به وسیله‌ی فویل آلومنیومی و پنبه‌ی مرطوب نگهداشته شد. برای تغذیه حشرات کامل از پنبه‌ی آغشته به آب عسل ۱۰ درصد استفاده شد که به همراه برگ‌ها داخل ظرف استوانه‌ای قرار گرفت. حشرات به صورت یک روز در میان به وسیله آسپراتور برقی از استوانه‌ها جمع‌آوری شده و برگ‌های حاوی تخم‌های شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی به ظروف مستطیلی (طول:۲۴، عرض: ۱۶، ارتفاع: ۹ سانتی‌متر، پوشیده شده با درپوشی از تور ارگانزه) انتقال یافت و پس از تبدیل شدن به لارو، برگ تازه در داخل ظروف حاوی لارو قرار گرفت (تخم‌های حاصل از حشرات کامل ظاهر شده از این مرحله، نسل ۱ آزمایشگاهی در نظر گرفته شد). در زمان ظهور حشرات کامل، حشرات جمع‌آوری شده و به ظروف تخم‌گیری انتقال داده شد.

[1] Antixenosis

[2] Antibiosis

تهیه محلول حاوی آنزیم کلسترول اکسیداز

کلسترول اکسیداز تهیه شده از شرکت کوپرت یک پودر جامد زرد رنگ و قابل حل در بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH =۷ است. برای این منظور بافر پتاسیم فسفات در آزمایشگاه شیمی دانشکده علوم پایه دانشگاه مراغه تهیه شد. ابتدا جرم مولی پتاسیم فسفات و سود محاسبه گردید برای تهیه بافر پتاسیم فسفات، ۱۳/۱۶ گرم پتاسیم فسفات در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و با کمک سود ۰/۱ مولار روی pH =۷ تنظیم شد. بعد از تهیه بافر، غلظت های ۰/۶ ، ۰/۲ و ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر از آنزیم کلسترول اکسیداز در بافر پتاسیم فسفات تهیه شد. تمامی وسیله‌های مورد استفاده با آب ژاول ضدعفونی گردید و در آون تحت دمای ۲۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند (Pollegioni *et al*., 2009).

اثر آنزیم کلسترول اکسیداز روی ترجیح تخم‌ریزی حشرات کامل در روی ارقام مختلف گوجه‌فرنگی (آزمون انتخابی Choice Test)

آزمایش بررسی ترجیح تخم‌ریزی در سه مرحله فنولوژیکی ۳۰ و ۴۵ و۶۰ روزگی سه رقم گوجه‌فرنگی شامل ارقام ازمیر، نیوتن و ارگون، کاشته شده در گلخانه صورت گرفت. برای این کار گلدان‌های حاوی گیاه کاشته شده در گلخانه در دمای ۸ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۱۰± ۶۰ درصد قرار گرفتند. در این آزمایش برای هر مرحله فنولوژیکی، تیمارهای مربوط به چهار غلظت و سه رقم گیاه میزبان شامل ۱۲ گلدان بود که هر ۱۲ گلدان در درون قفس‌هایی چوبی پوشیده شده با توری، به ابعاد ۱×۱×۱ مترمربع به تعداد ۵ تکرار بصورت تصادفی در کنار هم قرار گرفتند. سپس با چهار غلظت، ۰ (بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار)، ۰/۰۸، ۰/۲ و۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیترآنزیم کلسترول اکسیداز توسط آبپاش دستی محلول‌پاشی شدند. سه غلظت مورد مطالعه در این آزمایش براساس پژوهش (Purcell *et al*., 1993) که تاثیر آنزیم کلسترول اکسیداز را روی لاروهای کرم قوزه پنبه، *Anthonomus grandis* Boheman، مورد بررسی قرار داده بود انتخاب شد بدین صورت که ۳ مقدار از آنزیم کلسترول اکسیداز در ۱۰۰ میلی‌گرم از ماده غذایی که بالاترین، متوسط و کمترین میزان تاثیر را روی لاروهای قوزه پنبه داشتن انتخاب و این مقدارها با وزن یک برگ گوجه‌فرنگی مورد تغذیه شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی تناسب بسته شد و غلظت آنزیم مورد نیاز برای تیمار گیاهان گوجه‌فرنگی تعیین گردید. سپس ۲۴ ساعت بعد از تیمار گیاهان با آنزیم کلسترول اکسیداز، بسته به هر مرحله فنولوژیکی به ترتیب ۳۰ ، ۴۰ و۵۰ عدد حشره کامل نر و ماده ۲-۱ روزه در مرکز هر قفس رهاسازی شدند و درب قفس‌ها برای جلوگیری از خروج حشرات بسته شد. تفکیک حشرات نر و ماده به صورت زیر انجام گرفت: چفت در نرها به صورت یک خط ساده و در ماده‌ها به صورت یک دسته سه تایی از موهای نازک در حاشیه جلویی قاعده بال‌های عقبی است (Sannino and Espinosa, 2010). شکم شب‌پره‌های نر باریکتر و در قسمت عقبی نوک تیزتر است، در حالیکه در جنس ماده، شکم پهن‌تر و حجیم‌تر است (Sannino and Espinosa, 2010). سطح زیرین شکم حشرات نر به رنگ سفید تیره با پولک‌های خاکستری پراکنده در طرفین است در حالیکه در ماده‌ها این ناحیه به رنگ سفید خالص با ۴ سری خطوط سیاه مورب در پهلو است (Sannino and Espinosa, 2010). به این حشرات به مدت ۳ روز فرصت تخم‌گذاری داده شد بعد از ۳ روز حشرات با سم پایرویتروئیدی به زمین افتاده و درب قفس‌ها باز شد، سپس گلدان‌ها خارج و بوته‌ها کف‌بر شدند و کل بوته و اندام‌های هوایی گیاهان میزبان در آزمایشگاه زیر لوپ بررسی و تخم‌های گذاشته شده مورد شمارش قرار گرفتند. جهت بررسی ماندگاری آنزیم کلسترول اکسیداز آزمایش ترجیح تخم‌ریزی برای سه مرحله فنولوژیکی۳۰ و ۴۵ و ۶۰ روز به‌ترتیب ۱۵ و ۲۵ و ۳۰ روز بعد از تیمار گیاهان با همان

شرایط و روش فوق الذکر دوباره ارزیابی شد. در این آزمایش هم به‌ترتیب ۳۰ و ۴۰ و۵۰ عدد حشره بالغ نر و ماده به صورت جفت درون قفس‌ها رهاسازی شدند و به مدت سه روز فرصت تخم‌گذاری داده شد. بعد از سه روز بوته‌ها کف‌بر شدند و زیر لوپ در آزمایشگاه تعداد تخم‌های گذاشته شده شمارش شدند (Shiri and Gharekhani, 2015).

آزمایش اثر آنزیم کلسترول اکسیداز روی استقرار لاروهای نئونات

آزمایش بررسی استقرار لاروی، در سه مرحله فنولوژیکی۳۰ و ۴۵ و۶۰ روزگی در روی سه رقم گوجه‌فرنگی شامل ارقام ازمیر، ارگون و نیوتن کاشته شده در گلخانه صورت گرفت. برای این کار گلدان‌های حاوی گیاه کاشته شده در گلخانه در دمای ۸±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۱۰±۶۰ درصد قرار گرفتند. آزمایش بررسی استقرار لاروی در سه مرحله فنولوژیکی با ۵ تکرار در روی ۳ رقم گیاه گوجه‌فرنگی که تحت تیمار با چهار غلظت (بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار)، ۰/۰۸، ۰/۲ و ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر آنزیم کلسترول اکسیداز صورت گرفت. محلول‌پاشی به صورت دستی توسط آب‌پاش دستی از فاصله مشخص نیم‌متر انجام شد. ۲۴ ساعت پس از تیمار گیاهان، ۱۰ عدد تخم روی یک مقوا به ابعاد ۲ × ۰/۵ سانتی‌متر به کمک صمغ عربی چسبانده شد و به صورت تصادفی در نقاط مختلف گیاه روی هر گلدان، ۲ تا ۴ عدد مقوای حاوی تخم ۲-۱ روزه به وسیله صمغ عربی چسبانیده شد. بعد از تفریخ تخم‌ها کارت‌های چسبانده شده به گیاه از روی گیاه‌ها جمع‌آوری شدند و درصد تفریخ و استقرار لاروها محاسبه شدند. وجود دالان اولیه به‌عنوان شاخص استقرار لارو تلقی شد. رشد و نمو لاروها در دالان‌ها پیگیری شد و برای بررسی تاثیر تغذیه از میزبان‌های مختلف روی وزن شفیره‌های به‌دست آمده در طول آزمایش تمام شفیره‌های تشکیل شده، در روز سوم شفیرگی توسط ترازوی دیجیتالی حساس با دقت (۱۰-۴ گرم) توزین گردیده و در ظروف جداگانه نگهداری شد. پس از خروج حشره‌های کامل و تفکیک جنسی آن‌ها، وزن شفیره جنس نر و ماده تفکیک شده و به صورت جداگانه مقایسه گردیدند (Shiri and Gharekhani, 2015)، و تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط برنامه نرم‌افزاری SAS (ver. 9.1) صورت گرفت و نمودارها با استفاده از برنامه Excel رسم گردید.

نتایج:

ترجیح تخم‌ریزی حشرات کامل روی ارقام مختلف گوجه‌فرنگی

نتایج به‌دست آمده از آزمایش ترجیح تخم‌ریزی و تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که اثر هر چهار متغیر رقم، غلظت، زمان و فنولوژی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار هستند ولی اثرات متقابل فاکتورها معنی‌دار نبود. جهت بررسی ماندگاری آنزیم کلسترول اکسیداز این آزمایش ۱۵، ۲۵ و ۳۰ روز بعد از محلول‌پاشی تکرار و نتایج آن بررسی گردید. آنالیز داده‌ها نشان داد که اثر متقابل بین زمان-رقم و زمان-فنولوژی معنی‌دار بوده درحالی که اثر متقابل زمان-غلظت معنی‌دار نبوده است (جدول ۱).

بررسی تفاوت میانگین مربوط به سه رقم گوجه‌فرنگی مورد مطالعه در این آزمایش نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در میانگین تخم گذاشته روی سه رقم وجود دارد به‌طوری‌که بیش‌ترین میانگین تخم گذاشته شده روی رقم ارگون و کم‌ترین آن روی رقم ازمیر طی زمان اول (رهاسازی بلافاصله بعد از محلول‌پاشی) و زمان دوم (رهاسازی ۱۵، ۲۵ و ۳۰ روز بعد از محلول‌پاشی) است. بررسی‌ها بیان‌گر این است که تفاوت میانگین بین سه

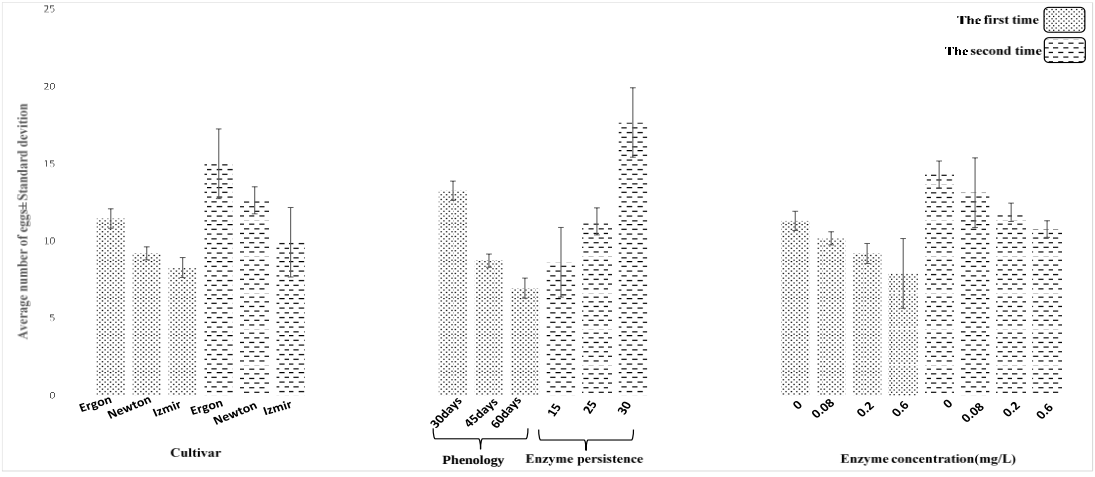
فنولوژی (۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز) از نظر آماری معنی‌دار است و کم‌ترین و بیش‌ترین تعداد تخم گزارش شده به ترتیب مربوط به فنولوژی ۳۰ و ۶۰ روز است. بررسی تفاوت بین سه غلظت آنزیم کلسترول اکسیداز (۰/۰۸ ، ۰/۲ و ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر) و شاهد (بافر پتاسیم فسفات) نشان می‌دهد که تفاوت میانگین تعداد تخم ثبت شده در غلظت‌های مورد مطالعه آنزیم با دز شاهد در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است. بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد تخم به ترتیب در غلظت‌های (۰/۰۸ و ۰/۶) ثبت شده است و با افزایش غلظت آنزیم کلسترول اکسیداز از تعداد تخم گذاشته شده روی گیاهان میزبان کاسته شده است (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس ترجیح تخم‌گذاری شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی طی سه دوره فنولوژیک (۳۰ و ۴۵ و ۶۰ روز) گیاه گوجه‌فرنگی محلول‌پاشی شده با آنزیم کلسترول اکسیداز (۱۵و ۲۵ و ۳۰ روز) بعد از محلول‌پاشی آنزیم.

Table 1. Analysis of variance of oviposition preference *Tuta absulta* on tomato plants were treated with Cholesterol oxidase enzyme during three phonologic periods (30, 45 and 60 day) and (15, 25 and 30 day) after enzyme spraying.

Source	df	Mean square	F value	Pr > F
Time	1	742.469	304.92	0.0001**
Cultivar	2	512.886	210.64	0.0001**
Dose	3	199.165	81.80	0.0001**
Phenology	2	1872.252	768.92	0.0001**
Time*Cultivar	2	34.636	14.22	0.0001**
Time*Phenology	2	59.320	24.36	0.0001**
Time*Dose	3	0.491	0.20	0.8950 ns
Cultivar*Dose	6	0.804	0.33	0.9207ns
Cultivar*Phenology	4	4.931	2.03	0.0906ns
Phenology*Dose	6	1.940	0.80	0.5701ns

**Significantly different(P<1%) * ،Significantly different(P<5%) ns No significant



شکل ۱- مقایسه ترجیح تخم‌گذاری شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی روی سه رقم گوجه‌فرنگی تیمار شده با غلظت‌های متفاوت آنزیم کلسترول اکسیداز طی زمان اول (۳۰ و ۴۵ و ۶۰ روز) و زمان دوم (۱۵ و ۲۵ و ۳۰ روز)

Fig. 1. Compretive oviposition prefrence (mean ± SD) of *Tuta absulta* on three cultivars of tomato plants treated with different concentration of Cholestrol oxidase enzyme during the first time (30, 45, 60s) and the second time (15, 25, 30s). (*The first time: Insects were released immediately after enzyme spraying. *The second time: Insects were released 15, 25, 30 days after enzyme spraying).

بررسی استقرار لاروهای نئونات و وزن شفیره‌های نر و ماده

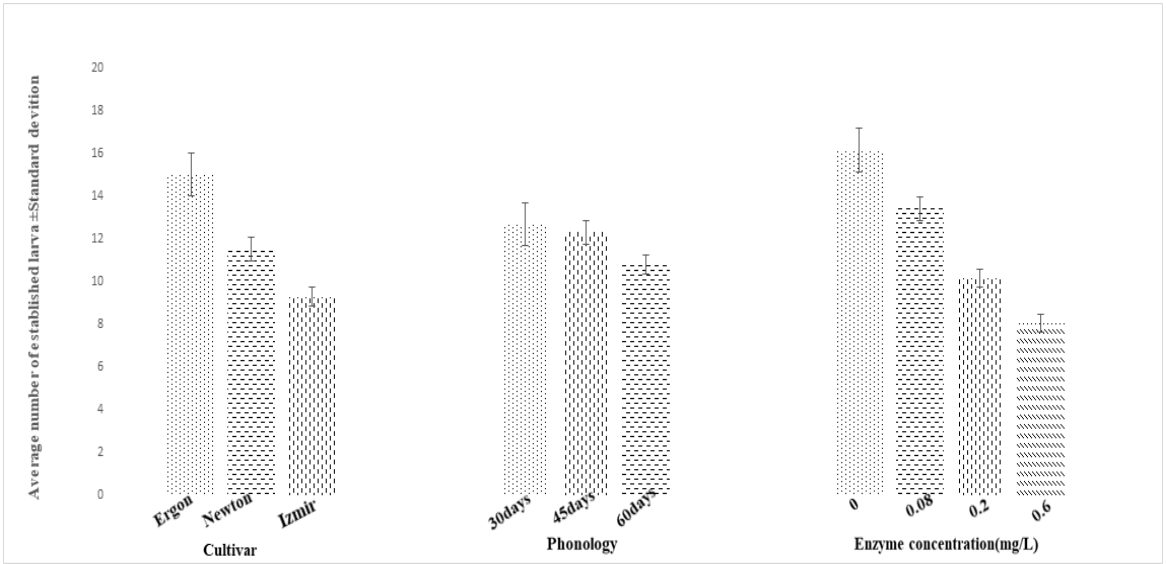
نتایج این آزمایش و تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان می‌دهد که تفاوت میانگین مربوط به غلظت (آنزیم کلسترول اکسیداز)، رقم و فنولوژی در هر سه مرحله ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۲)، به‌طوری‌که هم رقم، هم غلظت و هم فنولوژی روی درصد استقرار لاروها تاثیر گذاشته‌اند. هم‌چنین بیش‌ترین استقرار صورت گرفته در تیمار ۰/۰۸ میلی‌گرم بر لیتر آنزیم کلسترول اکسیداز روی رقم نیوتن و کم‌ترین استقرار مشاهده شده در تیمار ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر و روی رقم ازمیر بوده است. بررسی تفاوت میانگین مربوط به تیمارها بیان‌گر این بود که همواره، بین غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری وجود دارد. طی بررسی‌های صورت گرفته مشخص گردید که بیش‌ترین استقرار صورت گرفته طی فنولوژی ۳۰ روز و کمترین استقرار طی فنولوژی ۴۵ روز گیاه میزبان است (شکل ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس تعداد لارو استقرار یافته در روی گوجه‌فرنگی تیمارشده با کلسترول اکسیداز در طی سه دوره فنولوژیک (۳۰ و ۴۵ و ۶۰ روز) گیاه میزبان.

Table 2. Analysis of variance of larva established on tomato plants were treated with Cholestrol oxidase enzyme during three phonologic periods (30, 45 and 60 day) of host plants.

Source	df	Mean square	F value	Pr > F
Cultivar	2	201.50	67.27	0.0001**
Dose	3	320.16	76.84	0.0001**
Phenology	2	17.347	10.429	0.0001**
Cultivar*Dose	6	2.315	0.162	0.0001**
Cultivar*Phenology	4	6.438	0.450	0.77 ns
Phenology*Dose	6	0.884	0.62	0.99 ns

** Significantly different(P<1%) ،ns No significant.



شکل ۲- مقایسه لاروهای استقرار یافته شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی روی سه رقم گوجه‌فرنگی تیمار شده با غلظت‌های متفاوت از آنزیم کلسترول اکسیداز طی سه فنولوژی (۳۰ و ۴۵ و ۶۰ روز).

Fig. 2. Compretive larva established (mean ± SD) of *Tuta absulta* on three cultivars of tomato plants treated with different concentration of Cholestrol oxidase enzyme during three phenology (30, 45, 60s).

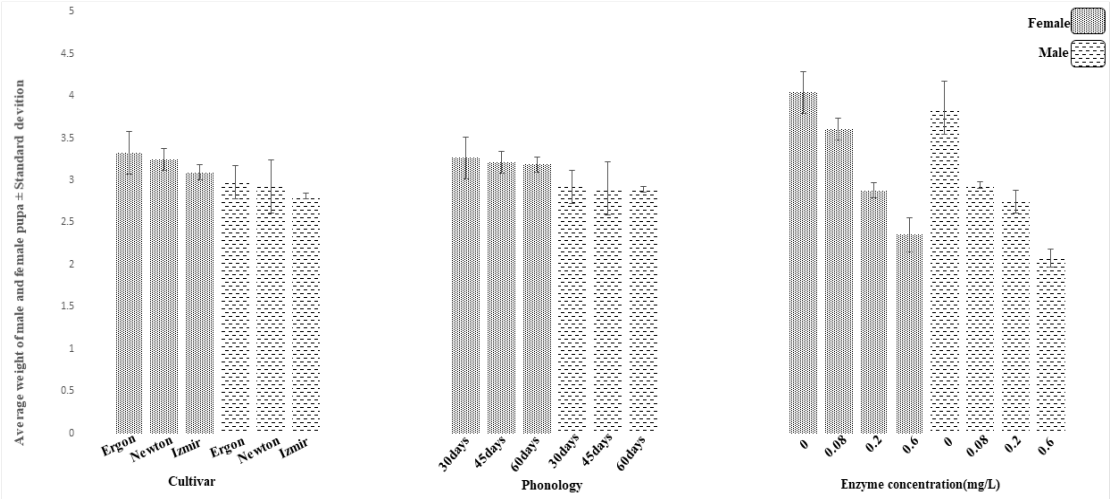
با توجه به نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها و جدول تجزیه واریانس مربوط به بررسی وزن شفیره‌ها در تیمارها (جدول ۳)، تفاوت میانگین مربوط به رقم، فنولوژی، غلظت مربوط به وزن شفیره‌های ماده و تفاوت میانگین مربوط به رقم و غلظت شفیره‌های نر در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. در حالی‌که اثر متقابل رقم – فنولوژی، رقم – غلظت و غلظت – فنولوژی معنی‌دار نبود. همان‌طور که در نمودار مربوط به تفاوت میانگین وزن شفیره‌های نر و ماده مشاهده می‌گردد، در طی هر سه مرحله ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز گیاهان میزبان بیشترین وزن شفیره‌های ماده ثبت شده به ترتیب روی رقم‌های ارگون، نیوتن و ازمیر بوده است. همچنین میانگین مربوط به وزن شفیره‌های نر روی رقم‌های ارگون و نیوتن با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند اما این تفاوت در روی رقم ازمیر نسبت به دو رقم دیگر در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. در طی سه مرحله فنولوژی ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز گیاهان میزبان، میانگین وزن شفیره‌های ماده در مرحله ۳۰ روز نسبت به دو مرحله ۴۵ و ۶۰ روز معنی‌دار بود. وزن شفیره‌های نر در هر سه مرحله ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز از نظر آماری معنی‌دار نبودند. با افزایش غلظت آنزیم کلسترول اکسیداز، به طور معنی‌دار از وزن شفیره‌های نر و ماده کاسته شده است (شکل ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس وزن شفیره‌های نر و ماده در روی گوجه‌فرنگی تیمار شده با آنزیم کلسترول اکسیداز طی سه دوره فنولوژیک (۳۰ و ۴۵ و ۶۰ روز) گیاه میزبان.

Table 3. Analysis of weight variance of male and female pupa on tomato plants were treated with Cholestrol oxidase enzyme during three phonologic periods (30, 45 and 60 day) of host plants.

	Male				Female		
Source	**df**	**Mean square**	**F value**	**Pr > F**	**Mean square**	**F value**	**Pr > F**
Cultivar	2	0.314	18.15	0.000**	0.667	44.85	0.0001**
Dose	3	19.364	1117.83	0.000**	20.33	1365.61	0.0001**
Phenology	2	0.009	0.54	0.58 ns	0.086	5.80	0.0003 *
Cultivar*Dose	6	0.073	4.24	0.006 ns	0.092	6.18	0.0001 **
Cultivar*Phenology	4	0.555	3.74	0.005 ns	0.084	1.940	0.112 ns
Phenology*Dose	6	0.033	1.93	0.081 ns	0.040	2.73	0.016**

**Significantly different(P<1%) * ،Significantly different(P<5%) ns No significant



شکل ۳- مقایسه وزن شفیره‌های نر و ماده شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی روی سه رقم گوجه‌فرنگی تیمارشده با غلظت‌های متفاوت آنزیم کلسترول اکسیداز طی سه فنولوژی (۳۰ و ۴۵ و ۶۰ روز).

Fig. 3. Compretive weight of male and female pupa (mean ± SD) of *Tuta absulta* on three cultivars of tomato plants treated with different concentration of Chorestrol oxidase enzyme during three phenology (30, 45, 60s).

بحث:

نتایج حاصل حاکی از آن است که با افزایش غلظت آنزیم کلسترول اکسیداز میزان تخم‌های گذاشته روی ارقام مورد مطالعه کاهش پیدا کرده است (جدول۱). علاوه بر این طبق بررسی‌های حاضر می‌توان عنوان کرد که فنولوژی گیاه میزبان نیز می‌تواند در ترجیح تخم‌گذاری این آفت تاثیر گذار باشد. بررسی‌ها نشان داد که میزان تخم‌گذاشته شده در طی دو زمان اول و دوم نیز تفاوت چشمگیری باهم داشتند و با گذشت زمان ترجیح تخم‌ریزی حشرات ماده روی رقم‌های مورد مطالعه در طی فنولوژی‌های متفاوت تغییر پیدا کرده است اما اثر متقابل بین زمان پاشش و میزان آنزیم کلسترول اکسیداز مورد استفاده معنی‌دار نبوده است (جدول ۱). تغییرات ایجاد شده در گیاهان تیمار شده با آنزیم کلسترول اکسیداز، از میزان ترجیح حشرات برای تخم‌گذاری روی آن‌ها کاسته است و آنزیم مزبور نوعی اثر دورکنندگی برای حشرات آفت ایجاد کرده است. تحلیل حس بویایی و واکنش رفتاری شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی به روش هد اسپیس (Haedspace)، نقش مهم مواد فرار برگ گوجه‌فرنگی را در تغذیه لاروها و تخم‌گذاری حشرات کامل ماده شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی نشان داده است (Kaiser and Oliver, 1976; Shiri and Gharekhani, 2015). شب‌پره‌های ماده با پی‌بردن به کم‌ترین تغییرات در مواد فرار برگ ارقام مختلف گوجه‌فرنگی، میزبان مناسب را برای تخم‌گذاری و تغذیه لاروها انتخاب می‌کنند. ترجیح یا عدم ترجیح حشره ماده برای تخم‌گذاری تحت تاثیر تنوع و نسبت این مواد فرار در ارقام مختلف گوجه‌فرنگی است که با فعالیت‌های متابولیک گیاه و نیز تفاوت در نوع تریکوم‌های روی برگ ارتباط دارد (Bleeker *et al.*, 2009, 2011; Kang *et al.*, 2010). ویژگی‌های ریخت‌شناسی و شیمیایی سطح برگ نیز تاثیر مستقیمی روی تخم‌گذاری دارد (Proffit *et al.*, 2011). از آنجا که حشرات ماده شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی تخم‌های خود را به صورت مستقیم و بدون هیچ پایه‌ای قرار می‌دهند و همچنین به دلیل پوشیده‌شدن سطح برگ‌های گوجه‌فرنگی از تریکوم، تخم‌ها به طور مستقیم تحت تاثیر این تریکوم‌ها و

محرک های شیمیایی ناشی از آن‌ها قرار می گیرند (Kang *et al.*, 2010).

در مطالعه حاضر از میزان استقرار لاروهای شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی بر ارقام مختلف گوجه‌فرنگی، در طی ۳ دوره فنولوژی رشدی گیاه گوجه‌فرنگی کاسته شده است که نشان می‌دهد تفریخ تخم‌ها علاوه بر اینکه تحت تاثیر ترکیبات شیمیایی ترشح شده از تریکوم‌های سطح برگ گوجه‌فرنگی که شامل موادی چون سولانین، دیمیسین و تریپسین وغیره در ارقام مختلف بوده است (Narvel, 1999)؛ تحت تاثیر افزایش غلظت آنزیم کلسترول اکسیداز نیز قرار گرفته و با افزایش غلظت آنزیم از تفریخ تخم‌ها کاسته شده است. ترکیبات شیمیایی برگ ارقام مختلف گوجه‌فرنگی در کنار آنزیم کلسترول اکسیداز، ایجاد کننده دو ساز وکار مقاومتی آنتی‌زنوز و آنتی‌بیوز علیه لاروها هستند. تاثیر آنتی‌زنوز باعث می‌شود لارو مینوز را ترک کرده و در جست‌وجو غذایی مناسب‌تر به ایجاد مینوزهای دیگر اقدام کند و گاهی در اثر گرسنگی بمیرد (Kaiser and Oliver, 1976).

در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری روی وزن شفیره‌های نر و ماده در طی فنولوژی‌های ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز ارقام مورد مطالعه گوجه‌فرنگی مشاهده شد. هم‌چنین غلظت‌های مختلف آنزیم کلسترول اکسیداز و ارقام مختلف گوجه-فرنگی نیز روی وزن شفیره‌های نر و ماده تاثیر معنی‌داری ایجاد کرده‌اند و با افزایش غلظت آنزیم از وزن شفیره کاسته شده است. بیش‌ترین و کم‌ترین وزن شفیره‌های نر و ماده به‌ترتیب روی ارقام ارگون، نیوتن و ازمیر ثبت گردید. کیفیت پایین غذای مورد تغذیه لاروها می‌تواند روی رشد آن‌ها تاثیر قابل توجهی داشته باشد. کیفیت پایین غذا باعث افزایش زمان رشد و نمو، کاهش وزن شفیرگی، کاهش استقرار لاروها، کاهش ظرفیت افزایش جمعیت و افزایش زمان تکمیل نسل می‌گردد (Proffit *et al.*, 2011; Safuraie Parizi *et al.*, 2014). این مطالب می‌تواند گواه بر ساز و کار آنتی‌زنوزی آنزیم کلسترول اکسیداز و رقم ازمیر نسبت به سایر ارقام مورد مطالعه باشد. وزن شفیره‌های محاسبه‌شده می‌تواند ملاکی برای رشد و نمو لاروهای آفت روی برگ‌های میزبان باشد، بالا بودن وزن شفیره‌ها می‌تواند بیان‌گر فعالیت و رشد و نمو بیش‌تر آفت و حساسیت بیش‌تر گیاه میزبان باشد (Ebadollahi, 2016). با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش، رقم‌های ارگون و نیوتن را نمی‌توان به عنوان ارقام مقاوم به شب‌پره مینوز گوجه‌فرنگی برای کشت در گلخانه و مزارع توصیه کرد، هر چند معرفی این ارقام می‌تواند برای انجام مطالعات بعدی در زمینه شناسایی عوامل فیزیکی و شیمیایی تاثیرگذار و همچنین مطالعات ژنتیکی به منظور ارتقا سطح مقاومت ارقام گوجه‌فرنگی با انتقال عوامل مقاومت به ارقام حساس، تا حد زیاد موثر باشد. از سوی دیگر ارقام حساس را می‌توان به عنوان گیاه تله برای کشت در گلخانه و مزارع گوجه‌فرنگی نیز پیشنهاد کرد. مقاومت گیاه میزبان در استراتژی مدیریت تلفیقی آفات می‌تواند یک روش مناسب برای کنترل آفات باشد و این مقاومت در گیاه می‌تواند توسط مکانیسم‌های آنتی‌زنوز، آنتی‌بیوز و تحمل و یا ترکیب این مکانیسم‌ها بیان شود (Painter, 1951). آنزیم‌های اکسیداتیو گیاهان، طبقه مهمی از پروتئین‌های گیاهی وابسته به مکانیزم دفاعی در مقابل حشرات محسوب می‌شوند. این آنزیم‌ها در فرآیند دفاع گیاه در مقابل حمله حشرات گیاه‌خوار و حتی برخی از پاتوژن‌های گیاهی موثر هستند. بررسی‌ها از سلامت آنزیم کلسترول اکسیداز برای انسان و حیوانات خبر می‌دهد، چرا که ساختمان این آنزیم نیز مانند سایر پروتئین‌ها تحت شرایط حرارت بالا، تخریب و غیرفعال می‌گردد (Pollegioni *et al.*, 2009). آنزیم کلسترول اکسیداز به عنوان نماینده‌ی جدیدی از آفت‌کش‌های نسل چهارم می‌تواند به عنوان جایگزینی مناسب برای آفت‌کش‌های شیمیایی مورد مطالعه دقیق‌تر و همه جانبه‌تر قرار گیرد.

References

Baniameri, V. and Cheraghian, A. 2011. The current status of Tuta absoluta in Iran and initial control strategies in: International symposium on management of *Tuta absoluta* (tomato borer) proceeding. Agadir, Morocco, November 16-18, 2011.

Corbin, D. R., Grebenok, R. J., Ohnmeiss, T. H., Greenplate, J. T. and Purcell, J. P. 2001. Expression and chloroplast targeting of cholesterol oxidase in transgenic tobacco plants. Plant Physiol. (126): 1116–1128.

Dudareva, N. Klempina, A. Muhlemann, J. K. and Kaplan, I. 2013. Biosynthesis, funcation and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. New Phytol. 198(1): 16-32.

Estay, P. 2000. Polilla del tomato *Tuta absoluta* (Meyrick). Instituto de investigations agropecuarias, centro regional de investigacion la platina, ministerio de agricultura Santiago chile. http:// www.inia.cl/medios/biblioteca/informativos/ NR 25648.pdf. [Accessed on 11 January 2010].

Etebari, K. and Matindoost, L. 2007. The fourth generation of biotech knowledge based bio-pesticides. Zeytoon Journal. Issue 12. [In Persian with English Summary].

Ebadollahi, S. 2016. Investigation of economic injury level of demographic fluctuations of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) and induction resistance by application of Jasmonic Acid in tomato. Master thesis. University of Maragheh, Faculty of Agriculture. 85 pp. [In Persian with English Summary].

Garzia, G. T., Siscaro, G., Biondi, A. and Zappala, L. A. 2011. Biology, distribution and damage of *Tuta absoluta*, an exotic invasive pest from South America. EPP/IOBC/FAO/NEPPO Joint International Symposium on management of *Tuta absoluta* (tomato borer, Lepidoptera: Gelechiidae) in collaboration with the IRAC and IBMA. November 16-18, 2011, Agadir, Morocco. P: 12.

Gfeller, A., Laloux, M., Barsics, F., Kati, D. E., Haubruge, E., du Jardin, P., Verheggen, F. J., Lognay, G., Wathelet, J. P. and Fauconnier, M. L. 2013. Characterization of volatile organic compounds emitted by barley (*Hordeum vulgare* L.) roots and their attractiveness to wireworms. J. Chem. Ecol. (39): 1129-1139.

Gilardon, E., Pocovi, M., Carmen, H. C. and Collavino, G. O. 2001. Role of tomato leaf glandular trichomes on oviposition of *Tuta absoluta*. Pesq. Agropec. Bras. Brasilia. 36(3): 585-588.

Greenplate, J. T., Duck, N. B., Pershing, J. C. and Purcell, J. P. 1995. Cholesterol oxidase: an oöstatic and larvicidal agent active against the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. Entomol Exp Appl (74): 253–258.

IRAC. 2011. *Tuta absoluta*- The tomato Leafminer or tomato borer recommendations for sustainable and effective resistance management. IRAC (Insecticide Resistance Action Committee). www.irac-onlion.org.

Kessler, A. and Baldwin, I. T. 2001. Defensive function of herbivore- induced plant volatile emissions in nature. Science. 291(5511): 2141-2144.

Labory, C. R. G., Santa-Cecilia, L. C., Maluf, W. R., Cardoso, M. D. G. and Souza, E. B. E. J. D. 1999. Indirect selection to 2-triddecanone content and its relation to tomato pinworm resistance. Pesq. Agropec. Bras. Brasilia. 34(5): 733-740.

Leite, G. L. D., Picanco, M., Lucia, T. M. C. D. and Moreira, M. D. 1999. Role of canopy height in the resistance of *Lycopersicon hirsutum* f. glaabratum to *Tuta absoluta* (Lep., Gelechiidae). J. Appl.Entomol. (123): 459-463.

Maffei, M. E. 2010. Sites of synthesis, biochemistery and functional role of plant volatiles. S.Afr. J.Bot. 76 (4): 612-931.

Meyrick, E. 1917. Descripitions of South American Micro-Lepidoptera.Tranc. Ent, Soc. London. (1): 25.

MacLachlan, J., Wotherspoon, A. T. L., Ansell, R. O. and Brooks, C. J. W. 2000. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. J Steroid Biochem Mol Biol. (72): 169–195.

Narvel, J. M. 1999. Assessment of plant introductions for increasing the genetic variability of soybean populations.72(1):47-52.

Oliveira, F. A., Silva, D. J. H., Leite, G. L. D., Jham, G. N. and Picanc, M. 2009. Resistance of 57 grreenhouse-grown accessions of Lycopersicon esculentum and three cultivars to *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Scientia Hortic. (119): 182-187.

Purcell, J. P., Greenplate, J. T., Jennings, M. J., Ryerse, J. S., Pershing, J., Sims, S. R., Prinsen, M. J., Corbin, D. R. Tran, M. and Sammons, D. 1993. Cholesterol oxidase: a potent insecticidal active against boll weevil larvae. Biochem Biophys Res Commun. (196): 1406–1413.

Puglielli, L., Friedlich, A. L., Setchell, K. D. R., Nagano, S., Opazo, C., Cherny, R. A., Barnham, K. J., Wade, J. D., Melov, S. and Kovacs, D. M. 2005. Alzheimer disease b–amyloid activity mimics cholesterol oxidase. J Clin Invest. (115): 2556–2563.

Pollegioni, L., Piubelli, L. and Molla, G. 2009. Cholesterol oxidase: biotechnological applications. FEBS Journal 276(2009)6857-6870. 2009 The Authors Journal compilation 2009 FEBS.

Proffit, M., Birgersson, G., Bengtsson, M., Reis, R., Witzgall, P. and Lima, E. 2011. Attraction and oviposition of *Tuta absoluta* females in response to tomato leaf volatiles. Journal of Chemical Ecology. 37(6): 565-574.

Painter, R. H. 1951. Insectresistance crop plants. Soil Science. 72(6): 481.

Safuraie-Parizi, S., Fathipour, Y. and Talebi, A. A. 2014. Evaluation of tomato cultivars to *Helicoverpa armigera* using two-sex life table parameters in laboratory. Journal of Asia-Pacific Entomology. 17(4): 837-844.

Sannino, L. and Espinosa, B. 2010. *Tuta absoluta*, guida alla conoscenza e recenti acquisizioni per una corretta difesa. L'Informatore Agrario. 66(46): 1-113.

Shiri, T. and Gharekhani, Gh. 2015. Biological parameter of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick) (lepidoptera: Gelechiidae) on the tree Solanaceous host plant. Agricultural Pest Management. (2): 39-47. [In Persian with English Summary].

Tholl, D., Boland, W., Hansel, A., Loreto, F., Rose, U. S. R. and Schntizler, J. P. 2006. Practical proaches to plant volatile analysis. Plant J. 45(4): 540-560.

Unsicher, S. B., Kunert, G. and Gershenzon, J. 2009. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. Curr. Opin. Plant. Biol. 12(4): 479-485.

Verheggn, F. J., Haubruge, E., De Moraes, C. M. and Mescher, M. C. 2013. Aphid responses to volatile cues from turnip plant (*Brassica rapa*) infested with phloem feeding and chewing herbivores. Arthropod-Plant Interact. 7(5): 567-577.

Wenming, W., Yongli, Z., Gunhuai, J., Lihuang, Z. and Wenxue, Z. 2004. Fine mapping of the rice bacterial blight resistance gene Xa-4 and its cosegregation marker. Chinese Science Bulletin. (45): 1779-1782.

Investigation on the Effect of Cholesterol Oxidase Enzyme on Oviposition and Establishment of Tomato Leaf Miner, *Tuta absolut*, Larvae on Three Tomato Cultivars

Salimi, S.* and Gharakhani, Gh.

Faculty of Agriculture, University of Maragheh, East Azerbaijan Province, Iran.

Received: Agu, 11, 2020 Accepted: Jan, 9, 2021

Abstract:

Tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) is one of the key and dangerous pests of Solanaceae plants in the world, especially in Iran which is controlled by various insecticides. Excessive use of chemical insecticides can quickly lead to pest resistance. The Use of protein-based compounds such as the enzyme Cholesterol oxidase, is a good alternative to chemical insecticides. In this research, the effect of cholesterol oxidase enzyme on the oviposition preference, larval establishment and weight of pupa of *Tuta absoluta* was investigated. The three tomato cultivars including Newton, Izmir and Ergon were treated with cholesterol oxidase enzyme at concentrations of 0.08, 0.2 and 0.6 mg/L during three phenological stages of 30, 45 and 60 day old plants. This experiment was carried out at 16:8 D: L and 60 ± 10% relative humidity and 25 ± 8 ^{0}C under greenhouse conditions. The results showed that by increasing the enzyme concentration, the oviposition, establishment of larva and weight of male and female pupa decreased. The highest amount of oviposition was on the Ergon cultivar at 0.08 mg/L and the lowest was recorded on the Izmir cultivar at the concentration of 0.6 mg/L. The highest establishment of larvae was recorded on Newton and Ergon cultivar at the concentration of 0.08 mg/L and the lowest was recorded on Izmir variety at the concentration of 0.6 mg/L. The results indicated that the cholesterol oxidase enzyme has the ability to control and repel the tomato leaf miner.

Key words: Cholesterol oxidase enzyme**,** Integrated Pest Management, *Lycopersicon esculentum*, Tomato leaf miner.

* **Corresponding author:** Samaneh Salimi, Email: salimisamaneh70@gmail.com