Name of Candidate	:	Naglaa Atallah Mehany Omar Degree : Ph.D.
Title of Thesis	:	Impact of *Bacillus thuringiensis* on some biological, histological and Physiological aspects of *Galleria mellonella* L. as a susceptible host.
Suprvisors	:	Prof.Dr.Monir Mohamed EL-Husseini and Prof.Dr.Mohamed Hisham El-Bishry
Department	:	Economic Entomology and Pesticides
Branch	:	Economic Entomology (Biological Control) Approval:

A B S T R A C T

The LC_{50} of Dipel 2X (*Bacillus thuringiensis* var.*kurstaki*) against larvae (L_3) of the greater wax moth, *Galleria mellonella* , was determined (4.784 g/100 g diet). Spraying the wax combs and wax foundation sheets with 100 g Dipel/L gave **100% control** and protected them for more than one year.

Biological studies showed: one week post treating the larval diet with Dipel (LC_{50}) in comparison with the control (/20 larvae) showed :

1)Larval weight decreased from 1.34 to 0.44 g ; **2) Consumed food** from 10.65 to 3.15 g; **3) Produced faeces** from 9.56 to 4.20 g; **4) Larval duration** in survivors from 11.56 to 14.2 days; **5) Weight of silk cocoons** from 0.19 to 0.08 g/15 cocoons; **6) Pupal weight** from 0.08 to 0.04 g; **7) Pupation %** from 100 to 41.6%; **8) Adult emergence** from 100 to 33.3%; **9) Adult deformations** from zero to 30.3%; and **10) Pupal period** remained unchanged (7.5 days).

Histopathological studies showed:

1) **Midgut** destruction of peritrophic membrane one day post treatment, followed by hypertrophy and elongation of midgut epithilial cells; which detached from each other and from the basement membrane falling into the lumen. Complete cell lysis and caryolysis of midgut ended by death of the diseased larvae.
2) **Silk glands** showed gradual lysis of cells and nuclei. Survivors showed highly decreased sericine in the silk thread explaining the decreased weight of the cocoons.
3) **Malpighian tubules** showed architectural alterations associated with cell lysis and caryolysis.

Physiopathological analysis showed:

1) **Carbohydrate content** decreased in general, especially total hydrolysable sugars **(THS)** that recorded 2.2% one day post treatment compared to 3.08% in the control, and on the 4th day by 2.8 and 3.1% in treatment and control, respectively.
2) **Lipids:** among **saponifiable lipids, caproic acid** appeared only in diseased larvae on the 1st day post treatment. Meanwhile, **linolenic** acid was detected only in the healthy larvae. The **unsaponifiable lipids cholestrol and stigmasterol** appeared only in healthy larvae and were absent in the diseased ones.
3) **Proteins:** three peptide groups: P2 (111-115 kda) .P5 (96-100), and P9 (76-80 kda) were detected only in the diseased larvae, where other peptides were found in both larval groups with different amounts.
4) **Activity of the enzyme G-6-ph dehydrogenase** resulted nine peptides of molecular weights of 212, 204, 197, 196, 195, 194, 102, 97 and 95 kda found only in diseased larvae, while another nine peptides were specific to the healthy larvae,*i.e.*, 192, 184, 183, 179, 178, 117, 116, 104, and 21 kda.

Prof. Dr. M. M. Hussein Prof. Dr. M. H. El-Bishry

إسم الطالبة: نجلاء عطا الله مهنى عمر الدرجة: دكتوراة

عنوان الرسالة: تأثير البكتريا باســـيللوس ثورنجينســـيز علـــى بعـــض الجوانـــب البيولوجيـــة، والهســـتولوجية، والفسيولوجية فى دودة الشمع الكبرى كعائل حساس.

الشرفون: أ.د.منير محمد الحسينى ، أ.د.محمد هشام البشرى

القسم: الحشرات الإقتصادية والمبيدات الفرع: الحشرات الإقتصادية

تاريخ منح الدرجة / /٢٠٠٣م

المستخلص العربى

إشتملت الدراسة تحديد التركيز النصفي المميت (LC_{50}) من المستحضر التجارى Dipel 2X المنتـــج بالبكتريـــا *Bacillus thuringiensis* var.*kurstaki* لكافحة يرقات دودة الشمع الكـــبرى *Galleria mellonella* L. بيولوجيـــا فى الأقراص و الأساسات الشمعية لنحل العسل فى المخزن، وكذلك تأثيره على بعض الجوانب البيولوجية والهســـتولوجية والفســـيولوجية على الآفة المستهدفة. بلغت الجرعة النصفية الساعة ٤,٧٨٤جرام من المستحضر / ١٠٠جرام من بيئة تغذية اليرقات. كمـــا بلغـــت درجة المكافحة ١٠٠%على المنتج الشمعى المخزون لمدة أكثر من عام بعد المعاملة رشا بتركيز ١٠٠جرام دايبل/لتر.

مقارنة بالكنترول غير المعامل، أدى التركيز LC_{50} لنقص وزن اليرقات من ١,٣٤إلى ٠,٤٦جرام/٢٠يرقة بعد أسبوع من المعاملـــة. كما إنخفضت كمية الغذاء المبتلع من ١٠,٦٥ إلى ٣,١٥جرام، ووزن البراز الناتج من ٩,٥٦ إلى ٤,٢٠جرام. أما طول فترة العمـــر اليرقى المتبقية حتى التعذير فقد إمتدت إلى ١٤,٢ مقابل ١١,٥٦يوم فى اليرقات السليمة. وإنخفض وزن الشرانق الحريرية فى المعاملـــة إلى ٠,٠٨مقابل ٠,١٩جرام/١٥شرنقة فى المقارنة. أيضا إنخفض وزن العذراء إلى ٠,٠٢ جرام/عذراء مقابل ٠,٠٨فى الكنترول مـــع إنخفاض نسبة التعذير فى المعاملة إلى ٤١,٦% بينما كانت ١٠٠%فى المقارنة، بينما لم تتأثر مدة العذراء (٧,٥يوم) بالمعاملة. إنخفضـــت نسبة خروج الحشرات الكاملة من العذارى فى المعاملة إلى ٣٣,٣% وصاحبها ظهر تشوهات بالكوامل الناتجة بلغت ٣٠,٣% بينمـــا خرجت الكوامل بنسبة ١٠٠% دون تشوهات فى الكنترول.

أظهرت الدراسة الهستولوجية للقناة الهضمية الوسطية (موقع تأثير الميكروب *B.t.*) إنهيار غشاء البلعة الغذائيـــة، وإســـتطالة الخلايـــا الطلائية وظهور فجوات بها، ثم بتقدم الوقت تتفكك الخلايا عن بعضها البعض وعن الغشاء القاعدى، مع تضخم الأنوية وإضمحلالهـــا، وأخيرا تسقط مجموعات كبيرة من الخلايا فى فراغ القناة الهضمية حيث تنتهى تلك المظاهر بموت اليرقة. كذلك ظهر نقـــص شـــديد فى محتوى السيريسين بغدد الحرير مصاحبا لظهور فجوات بالسيتوبلازم وتضخم وإضمحلال الخلايا الطلائية المكونة لغدد الحرير مما يفســـر انخفاض وزن الشرانق. كما تأثرت أنابيب مالبيجى حيث تلاشت الحافة شبيهة القرص الشمعى وإضمحلت الأنوية كمظـــهر للتدمـــير وتوقف الوظيفة.

وأظهرت الدراسة الفسيولوجية بتتبع التغيرات التى طرأت على المحتوى الكلى والنوعى للكربوهيدرات، والدهون، والبروتينات، وانـــزيم جلوكوز-٦-فوسفات ديهيدروجينيز فى اليرقات المغتذية علىبيئة معاملة بالتركيز النصفي المميت (LC_{50}) تغـــيرات فســـيومرضية (**physiopathological changes**)أثناء فترة حضانة المرض مقارنة باليرقات السليمة (الكنترول).حيث انخفضت الســـكرات **THS** ، واقتصر ظهور **caproic acid** فى اليرقات المريضة ، **linolenic acid** فى السليمة كدهون . كما ظهرت بيتـــدات بأوزان جزيئية محددة فى اليرقات المريضة لم تتواجد فى اليرقات السليمة عند تحليل البروتينات وكذلك عند دراسة نشـــاطات الإنـــزيم **Glucose –6-phosphate dehydrogenase** فى كل من اليرقات المريضة والسليمة .

IMPACT OF *BACILLUS THURINGIENSIS* ON SOME BIOLOGICAL, HISTOLOGICAL, AND PHYSIOLOGICAL ASPECTS OF *GALLERIA MELLONELLA* L. AS A SUSCEPTIBLE HOST

CONTENTS

		Page
1.	INTRODUCTION	1
2.	REVIEW OF LITERATURE	4
2.1.	Toxicity of *B.thuringiensis* and Control of *G.mellonell*	4
2.2.	Effect of *B.t.* on Some Biological Parameters in *G.mellonella*	9
2.2.1.	Larval weight	9
2.2.2.	Food consumption	10
2.2.3.	Larval duration	12
2.2.4.	Pupal stage	13
2.2.5.	Adult stage	14
2.3.	Histopathology	16
2.3.1.	Larval midgut	16
2.3.2.	Silk production	17
2.3.3.	Malpighian tubules	18
2.4.	Physiopathological Effects of *B.t.* in Certain Lepidopteran Larvae	20
2.4.1.	Carbohydrates	20
2.4.2.	Lipids	22
2.4.3.	Protein	24
2.4.4.	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	29
3.	MATERIAL AND METHODS	31
3.1.	Rearing the Greater Wax Moth, *G.mellonella*	31
3.2.	The Tested *Bacillus thuringiensis*	31
3.3.	Control of *G.mellonella* in Stored Bee Wax Foundation and Combs	33
3.4.	Larval Treatment	33
3.5.	Effect of *B.t.* on Some Biological Parameters	33
3.6.	Effect of *B.t.* on Some Histological Structures	34
3.7.	Effect of *B.t.* on Some Physiological Parameters	34
3.7.1.	Determination of carbohydrate fractions	35
3.7.1.1.	Total hydrolysable carbohydrates	35
3.7.1.2.	Total soluble sugars	35
3.7.1.3.	Reducing sugars	36
3.7.1.4.	Non-reducing sugars	36
3.7.2	Total lipids	36
3.7.2.1.	Separation of fatty acids and unsaponifiables	36
3.7.2.2.	Methylation of fatty acids	36
3.7.2.3	GLC of fatty acid methyl esters and unsaponifiables	37
3.7.3.	Protein electrophoretic studies	37

3.7.3.1.	Protein extraction	37
3.7.3.2.	Preparation of samples and the standards	38
3.7.3.3.	Preparing of gels	38
3.7.3.4.	Loading of samples and gel running	39
3.7.3.5.	Staining, drying and densiometric scanning of the gel	39
3.7.4.	Enzyme activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase	41
3.7.5.	Cluster analysis (Dendrogram)	41
3.8.	Analysis of Biological Parameters	41
4.	RESULTS AND DISCUSSIONS	43
4.1.	Toxicity of *B.t.*var.*kurstaki* to *G.mellonella*	43
4.2.	Control of *G.mellonella* in Stored Combs and Wax Foundation	46
4.3.	Effect of *B.t.*var.*kurstaki* (LC50) on Some Biological Parameters in *G.mellonella*	49
4.3.1.	Larval weight	49
4.3.2.	Consumed food	51
4.3.3.	Faeces production	55
4.3.4.	Duration of survived larval stage	56
4.3.5.	Weight of the silk cocoon	56
4.3.6.	Pupal weight	58
4.3.7.	Pupal period	59
4.3.8.	Larval mortality	59
4.3.9.	Pupation percent	60
4.3.10.	Adult emergence	60
4.3.11.	Adult deformation	61
4.4.	Histopathological Studies	61
4.4.1.	Midgut	61
4.4.2.	Silk and silk glands	65
4.4.3.	Malpighian tubules	67
4.5.	Physiopathological Analysis	69
4.5.1.	Carbohydrates	69
4.5.1.1.	Total hydrolysable sugars (THS)	69
4.5.1.2.	Total soluble sugars (TSS)	70
4.5.1.3.	Reducing sugars (RS)	71
4.5.1.4.	Non-reducing sugars (NRS)	71
4.5.2.	Total lipids	72
4.5.2.1.	Saponifiable lipids	75
4.5.2.1.1.	One day post treatment	75
4.5.2.1.2.	Two days post treatment	79
4.5.2.1.3.	Three days post treatment	79
4.5.2.1.4.	Four days post treatment	84
4.5.2.1.5.	Five days post treatment	84
4.5.2.2.	Unsaponifiable lipids	89

4.5.2.2.1.	One day post treatment	93
4.5.2.2.2.	Two days post treatment	93
4.5.2.2.3.	Three days post treatment	98
4.5.2.2.4.	Four days post treatment	98
4.5.2.2.5.	Five days post treatment	98
4.5.3.	Protein patterns	103
4.5.3.1.	Peptides of high molecular weight	103
4.5.3.2.	Peptides of medium and low molecular weight	107
4.5.3.3.	Clustering of peptides (Dendrogram)	109
4.5.4.	Enzyme activities of G-6-phosphate dehydrogenase	111
5.	SUMMARY	117
6.	REFERENCES	123
7.	Annex	142
7.1.	List of Tables	142
7.2.	List of Figures	143
7.3.	List of Abbreviations	146
8.	ARABIC SUMMARY	