Name of Candidate: Aziza Hassan Mohamady **Degree:** Ph.D.
Title of thesis: Biochemical and Biological effects of some insecticides on cotton leafworm
Supervisors: Prof. Dr. Mohy El-Dien Aly Osman, Prof. Dr. Mohamed Nabil Foaad Shaaban and Prof. Dr. Anwar Abdel Aziz Hamama
Department: Biochemistry
Branch .....Approval.....

ABSTRACT

The present work was conducted to utility of biochemical assays beside biological assays for detection of resistant in *S. littoralis*.

1. Biological effects:

1.1. Development of resistance to profenofos: The rate of development of resistance to Profenofos in *S. littoralis* had been studied during the 13 generations of selection with this compound. The resistance ratio increased to 41.17-fold at the end of the selection course in G_{13}.

1.2. Pattern of cross-resistance to insecticides in the Profenofos-resistant strain of S. littoralis: The Profenofos-resistant strain exhibited high cross-resistance to Fenvalerate, moderated level of cross-resistance occurred by Thiodicarb and Beta-cyfluthrin and low cross-resistance obtained with Lufenuron, Triflumuron and Methomyl.

1.3. Reversion of resistance in the resistant strain after rearing in the absent of selection with Profenofos: The resistance ratios for all tested compounds decreased in G_2, G_4, and G_5. On the other hand, resistance increased following selection of G_5 larvae with Profenofos in G_{6t}.

1.4. Susceptibility of different larval instars of laboratory and resistant strains of *S. littoralis* to some insecticides: Data indicated that, the 2nd larval instar was the most susceptible instar followed by the 3rd, 4th and lastly 5th instar. Lufenuron was the most toxic compound, followed by Beta-cyfluthrin and Cyanophos. Larvae from resistant strain were more tolerance to insecticides than the laboratory strain.

1.5. The delayed effect of sub-lethal concentration (LC_{50}) of Cyanophos, Beta-cyfluthrin and Lufenuron on the biotic potential and some biological aspects of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.): Data indicated that, treatment of the 4th instar larvae of laboratory and resistant strains with tested insecticides reduced the percentage of pupation, adult emergence, egg production and egg hatchability in the resulting female moths. The data showed that, Lufenuron was highly effective against the *4th* instar larvae of laboratory and resistant strain. Results indicated that, Cyanophos and Beta-cyfluthrin prolonged the larval and pupal durations; while the adult life span was shortened. The two tested insecticides reduced the fecundity of resulted adults and the hatchabality of deposited eggs of laboratory and resistant strains of the cotton leafworm.

1.6. Effect of treatment with the LC_{15} and LC_{30} of chitin synthesis inhibitor (Lufenuron) on susceptibility and the resistance pattern in Profenofos- resistant strain of *Spodoptera littoralis*: Results indicated that, most of the mortality could be ascribed to the molt disturbing effects revealed as larvae which had failed to free themselves from their old larval skin. The pattern of inhibition in normal pupation and adult emergence produced by LC_{15} and LC_{30} of Lufenuron was clearly reflected in percentage of total mortality. It is interesting to indicated here that the eggs laid by

M.A.C.

moth that resulted from the treatment with LC_{30} of Lufenuron didn't hatch, therefor no next generation was produced from this treatment. Results also indicated that, the profenofos-resistant strain which has different cross-resistance levels to different insecticides when treated with $LC_{15}$of Lufenuron for one generation decreased obviously the resistance levels to some insecticides, on the other hand increased the others.

2. Biochemical effects:

2.1. Determination of some biochemical mechanisms of resistance in Laboratory, resistant and reverted strains of *S. littoralis* :

2.1.1. Esterase and Glutathione S-transferases activities: Results revealed that, activities of esterases and glutathione -S-transferases were higher in larvae of resistant strain than laboratory strain.

2.1.2. Activity of Acetylcholinesterase and sensitivity to inhibition by Methomyl and Chlorpyrifos: The highest activity was measured in resistant larvae. Activities decreased in the absence of selection in the R-G_5 strain and decreased also in larvae of R-G_{6t}.Results showed that acetylcholinesterase of the resistant strain was less sensitive than that from the laboratory strain to inhibition by Chlorpyrifos and Methomyl.

2.2. Effect of the (LC_{50}) of Cyanophos, Beta-cyfluthrin and Lufenuron on total protein contents of different larval tissues of laboratory and resistant larvae of *S. littoralis*:

2.2.1.Total protein content: Results revealed that, the total protein concentration of the haemolymph was much higher than that of the gut and fat body tissues of untreated and treated larvae of laboratory and resistant strains. Results indicated that, there were non-significant decreased and increased in haemolymph, fat body and gut protein contents of treated larvae of laboratory and resistant strains than the untreated ones.

2.2.2. Refraction of protein: The treatment with the tested insecticides produced some differences in SDS protein patterns (PAGE) in the three tissues of treated larvae than the untreated larvae of laboratory and resistant larvae of *S. littoralis* .

2.3. Effect of the sub-lethal concentration (LC_{50}) of Cyanophos, Beta-cyfluthrin and Lufenuron on esterase patterns of different tissues of laboratory and resistant larvae of *S. littoralis*: The analysis of isozyme esterases patterns was carried out by using three substrates and revealed that the three tested insecticides caused the increased and decreased of esterase activities. It is interesting to notice that, most of number of band and intensity of this band were higher in resistant larvae than that found in laboratory larvae of *S. littoralis*. It could be concluded that the resistant strain of *S. littoralis* has very active esterase isozymes than laboratory strain.

2.4. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) of the untreated and treated larvae of the untreated and treated larvae of laboratory and resistant strains of *S. littoralis*: Statistical analysis of obtained data revealed that the highest difference in DNA sequences was detected between the untreated and treated larvae. The comparison between the two strains of *S. littoralis* showed differences in the sizes and numbers of the amplified fragments per primer for each strain and each treatment, indicating a high degree of variability between them.

N. A. C

أسم الطالب / عزيزة حسن محمدي الدرجة / الدكتوراه
عنوان الرسالة / التأثيرات البيوكيميائية والبيولوجية لبعض المبيدات علي دودة ورق القطن.
المشرفون : أ.د / محي الدين علي عثمان ، أ.د / محمد نبيل فؤاد شعبان
أ.د / أنور عبد العزيز حمامة
قسم : الكيمياء الحيوية فرع..... تاريخ منح الدرجة .....

الخلاصة

تهدف هذه الدراسة إلى إمكانية أستخدم الاختبارات البيوكيميائية بجانب الاختبارات البيولوجية في الكشف المبكر عن تكون ظاهرة المقاومة في الحشرات وذلك بتتبع بعض المكونات البيوكيميائية وربطها بظيور ظاهرة المقاومة مثل تقدير بعض الأنشطة الأنزيمية المسئولة عن المقاومة وذلك للتغلب آو علي الأقل التقليل من المشاكل الناجمة عن ظاهرة المقاومة.

١- التاثيرات البيولوجية:

١- **تطور المقاومة في دودة ورق القطن لمبيد البروفينوفوس:** حيث تم عمل ضغط انتخابي ليرقات العمر الرابع للسلالة الحقلية بالتركيز النصف مميت (LC_{50}) من مبيد البروفينوفوس لمدة ١٣ جيل باستخدام طريقة العمر. ومع استمرار الانتخاب حدث زيادة في معدل المقاومة ليصل في نهاية الانتخاب إلى٤١,١٧ ضعف.

٢- **المقاومة المشتركة للمبيدات:** وجد أن السلالة المقاومة للبروفينوفوس صاحبها مقاومة مشتركة عالية للمبيدات البيرثرويدية المختبرة. ومقاومة متوسطة للمبيدات الكرباماتية ومقاومة ضعيفة لليوفينيرون والترای فلوميرون

٣- **قياس انعكاس المقاومة في السلالة المقاومة لمبيد البروفينوفوس:** وذلك عن طريق تربية السلالة المقاومة في المعمل لمدة خمسة أجيال بدون معاملة فلوحظ انخفاض في معدل المقاومة للمبيدات المختبرة في الجيل الثاني والرابع والخامس إلا أنة حدث زيادة في معدل المقاومة في الجيل السادس وذلك عند إعادة معاملة السلالة المقاومة بالبروفينوفوس في الجيل الخامس.

٤- **حساسية الأعمار اليرقية المختلفة لدودة ورق القطن للسلالة المعملية والمقاومة للمركبات المختبرة:** أظهرت النتائج أن يرقات العمر الخامس أكثر تحملا يليه العمر الرابع ثم الثالث ثم الثاني للمبيدات المستخدمة (السيانوفوس- البيتاثفلوسرين – اليوفينيرون).وان مبيد اليوفينيرون هو اكثر المبيدات تأثيرا. وأن الأعمار اليرقية للسلالة المقاومة كانت اكثر تحملا للمبيدات عن السلالة المعملية.

٥-**تأثير معاملة يرقات العمر الرابع لدودة ورق القطن بالتركيز النصف للمبيدات المختبرة علي الكفاءة الحيوية** و بعض الظواهر البيولوجية لها: لوحظ أن المركبات المختبرة كانت شديدة الفاعلية علي العمر اليرقي الرابع. فقد حدث انخفاض كبير في نسبة التعذير وخروج الفراشات الكاملة نتيجة معاملة السلالة المعملية والمقاومة بالتركيز النصف مميت بالسيانوفوس والبيتاثيفلوسرين وانعكس ذلك بوضوح علي النسبة المئوية الكلية للموت. وقد أحدثا كلا من البيتاثيفلوسيرين والسيانوفوس استطالة في فترة العمر اليرقي وعمر العذراء بينما نقص عمر الفراشات وأيضا حدث نقصا كبير في خصوبة الفراشات الناتجة ونسبة فقس البيض.

٦-**تأثير المعاملة بمثبط تكوين الكيتين (اليوفينيرون) لمدة جيل واحد علي حساسية السلالة المقاومة و المقاومة المشتركة بها:** تشير النتائج إلى أن معظم نسب الموت في الطور اليرقي يرجع إلي حدوث اضطرابات في عملية الانسلاخ. وقد حدث انخفاض كبير في نسبة التعذير وخروج الحشرات الكاملة.

وقد قللت كثيرا المعاملة بتركيزي الليوفينيرون من وضع البيض كما أحبطت نسبة الفقس خصوصا عند المعاملة بتركيز LC_{30} فلم يفقس البيض الموضوع. وقد أثبتت النتائج أيضا أن المبيدات أصبحت أكثر فاعلية إلا انه حدث زيادة في معدل المقاومة بالنسبة للمبيدات البيرثرويدية.

ب- التأثيرات البيوكيمائية:

١- **تقدير نشاط إنزيمي الأستريز و الجلوتاثيون أس ترانسفيريز** .أظهرت النتائج ارتفاع نشاط كلا الأنزيمين في السلالة المقاومة عند مقارنته بالسلالة المعملية وأنة توجد علاقة موجبة ما بين المقاومة ونشاط أنزيمي الاستريز والجلوتاثيون أس ترانسفيريز.

٢- **تقدير نشاط إنزيم الاستيل كولين أستريز وحساسيته للتثبيط بالميثوميل والكلوربيروفوس:** لوحظ زيادة نشاط هذا الأنزيم في السلالة المقاومة عند مقارنتها بالسلالة المعملية بينما قل نشاط هذا الأنزيم عند غياب المعاملة. ولوحظ قلة حساسية أنزيم الاستيل كولين استيريز في السلالة المقاومة للتثبيط بالمقارنة بالسلالة المعملية.

٣- **تأثير المعاملة بالتركيز النصف مميت للسيانوفوس والبيتاثيفلوسرين والليوفينيرون على بروتين الأنسجة المختلفة ليرقات السلالة المعملية والمقاومة لدودة ورق القطن:**

أ- **المحتوى الكلى لبروتين:** تشير النتائج إلى ارتفاع محتوى البروتين الكلى في الهيموليمف عن المعي والجسم الدهني في كلا من السلالتين المعملية والمقاومة. وقد أدت المعاملة بالسيانوفوس والبيتاثيفلوسرين والليوفينيرون إلى تأثيرات متغيرة ما بين الزيادة والنقص الغير معنوية في محتوى البروتين الكلى لكلا من الهيموليمف والجسم الدهني و المعي في كلا من السلالتين المعملية والمقاومة.

ب- **تفريد البروتين:** تشير النتائج أن معاملة السلالتين *المعملية والمقاومة بالمبيدات المختبرة أحدثت* بعض الاختلافات في حزم البروتينات عند تفريدها باستخدام جهاز الفصل الكهربي في الأنسجة المختلفة للحشرة وأن هناك بعض الحزم البروتينية تظهر في السلالة المقاومة وتختفي في السلالة المعملية. وأن هناك انخفاض في عدد احزم البروتينية بالجسم الدهني عند مقارنتها بمعي الحشرة. وقد لوحظ أن معظم الحزم البروتينية قد زادت في كثافتها بعد معاملة كلا السلالتين بالليوفينيرون

٤- **تأثير المعاملة بالتركيز النصف مميت للمبيدات المختبرة للسلالة المعملية والمقاومة علي أنزيم الاستيرازيز في الأنسجة المختلفة لدودة ورق القطن عند فصلها علي جيل البولي اكريلاميد:** أوضحت النتائج أن النشاط الأنزيمي في الأنسجة المختلفة للسلالتين الحساسة والمقاومة لدودة ورق القطن مع الأوساط الأنزيمية المختلفة أظهر اختلافا كبير ولوحظ وجود بعض الحزم في السلالة المقاومة فقط واختفائها في السلالة المعملية ولذلك اعتبرت هذه الحزم الأنزيمية مميزة للسلالة المقاومة وأنها هي التي تجعلها قادرة علي إزالة سمية المبيدات التي تتعرض له.

٥- **تأثير المعاملة بالتركيز النصف مميت للسيانوفوس والبيتاثيفلوسرين والليوفينيرون علي المادة الوراثية للسلالة المعملية والمقاومة لدودة ورق القطن:** قد أوضح استخدم طريقة التضخيم العشوائي ل DNA عن طريق جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل بعض الاختلافات في المادة الوراثية بين اليرقات المعاملة والغير معاملة وأيضا بين يرقات السلالتين المعملية والمقاومة لدودة ورق القطن . وأن البادئات العشوائية (OPA-7,16, OPB-15 and 20) كانت ذات كفاءة عالية في تحديد درجة القرابة أو الاختلاف ما بين السلالتين اكثر من البادى العشوائي ا (OPA-10).

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION.....	1
1. REVIEW OF LITERATURE.....	4
1.1. Biological Effects.....	4
1.1.1. Development of resistance to insecticides.....	4
1.1.2. Cross-resistance to insecticides	6
1.1.3. Reversion of resistance after discontinued use of insecticides...	10
1.1.4. Effect of insecticides on susceptibility of larval stage of insect..	12
1.1.5. The delayed effect of insecticides on some biological aspects of insect	15
1.2. Biochemical Effects.....	22
1.2.1. Effect of insecticides and chitin synthesis inhibitors on the biochemical aspects of insects.....	22
1.2.1.1. Mechanism of resistance to organophosphorus insecticides in insect.....	22
1.2.1.1.1. Esterases.....	22
1.2.1.1.2. Glutathione S-transferase.....	32
1.2.1.1.3. Acetylcholinesterase.....	36
1.2.1.2. Effect of insecticides and chitin synthesis inhibitors on protein in insect.....	46
1.2.2. Effect of insecticides and chitin synthesis inhibitors on DNA of insect pests.....	53
2. MATERIALS AND METHODS.....	61
2.1. The cotton leafworm strains.....	61
2.1.1. Laboratory strain (L-S).....	61
2.1.2. Resistant strain (R-S).....	61
2.2. Insecticides used.....	61

2.3. Preparation of concentrations..... 65
2.4. Method of application..... 65
2.5. Biological effects..... 65
2.5.1. Build up of resistance strain..... 65
2.5.2. Cross-resistance procedure..... 66
2.5.3. Reversion of resistance in the resistant strain after rearing in the absence of selection with Profenofos..... 66
2.5.4. Effect of Cyanophos, Beta-cyfluthrin and Lufenuron on susceptibility of larval stage of *S. littoralis*..... 67
2.5.5. Effect of treatment with Cyanophos, Beta-cyfluthrin and Lufenuron on the biotic potential of *S.littoralis*..... 67
2.5.6. Effect of selection for only one generation with chitin synthesis inhibitor (Lufenuron) on the susceptibility and cross-resistance pattern of the Profenofos-resistant strain of *S. littoralis*..... 68
2.6. Biochemical Effects..... 68
2.6.1. Preparation of larval samples for biochemical studies..... 68
2.6.2. Determination of esterase activity..... 69
2.6.3. Determination of Glutathione S-transferase activity... 70
2.6.4. Determination of AChE activity and inhibition..... 72
2.6.5. Determination of the total protein content..... 73
2.6.6. Fractionation of haemolymph, fat body and gut proteins by using denaturing SDS- PAGE technique 75
2.6.7. Electrophoretic separation of esterases on non-denaturing PAGE technique 79
2.7. Molecular biology assay..... 83
2.7.1. Preparation of buffers..... 84
2.7.2. Isolation and purification of genomic DNA 85

(phenol extraction and ethanol precipitation of DNA)...

2.7.3. Determination of the concentration and purity of DNA.... 86

2.7.4. Preparation of PCR Reactions..... 86

2.7. 5. RAPD Analysis..... 88

3. RESULTS AND DISCUSSION 90

3.1. Biological Studies..... 90

3.1.1. Rate of development of resistance to Profenofos 90

3.1.2. Cross-resistance pattern to insecticides and citin synthesis inhibitors in profenofos-resistant strain of *S. littoralis*... 94

3.1.3. Reversion of resistance in the resistant strain after rearing in the absence of selection with Profenofos..... 99

3.1.4. Susceptibility of different larval instars of laboratory and resistant strains of *S. littoralis* to some insecticides..... 104

3.1.5. The delayed effect of sub-lethal concentration (LC_{50}) of Cyanophos, Beta-cyfluthrin and Lufenuron on the biotic potential and some biological aspects of the cotton leafworm *S. littoralis*..... 119

3.1.5.1. Effect of treatment the 4th instar larvae of *S. littoralis* with the tested insecticides on biotic potential..... 119

3.1.5.2. Effect of treatment with LC_{50} of Cyanophos and Beta-cyfluthrin on some biological aspects..... 122

3.1.6. Effect of treatment with the chitin synthesis inhibitor (Lufenuron) on susceptibility and the resistance pattern in Profenofos- resistant strain of *S. littoralis*..... 127

3.1.6.1. Effect of Lufenuron treatment on susceptibility of the Profenofos-resistant strain of *S. littoralis*..... 126

3.1.6.2. Effect of selection for only one generation with on the crosss-resistance pattern of the Profenofos- resistant strain of *S. littoralis*..... 130

3.2. Biochemical Studies..... 135

3.2.1. Determination of some biochemical mechanisms of resistance in laboratory, resistant and reverted strains of *S. littoralis* 135

3.2.1.1. Esterase activities..... 135

3.2.1.2. Glutathione S-transferase activities 139

3.2.1.3. Activity of acetylcholinesterase AChE and sensitivity to inhibition by Methomyl and Chlorpyrifos..... 141

3.2.2. Effect of treatment with LC_{50} of Cyanophos, Beta-cyfluthrin and Lufenuron on total protein contents of different larval tissues of laboratory and resistant larvae of *S. littoralis*..... 147

3.2.2.1. Protein content..... 147

3.2.2.2. Fractionation of protein patterns..... 157

3.2.3. Effect of treatment with LC_{50} of Cyanophos, Beta-cyfluthrin and Lufenuron on esterase patterns of different tissues of laboratory and resistant strains of *S. littoralis*..... 186

3.2.3.1. Esterase patterns of haemolymph, fat body and gut tissues of untreated and treated larvae of laboratory and resistant strains with α-naphthyl acetate..... 186

3.2.3.2. Esterase patterns of haemolymph, fat body and gut tissues of untreated and treated larvae of laboratory and resistant strains with β-naphthyl acetate..... 197

3.2.3.3. Esterase patterns of haemolymph, fat body and gut tissues of untreated and treated larvae of laboratory and resistant strains with α-naphthyl butyrate..... 212

3.2.4. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) of the untreated and treated larvae of laboratory and resistant strains of *S. littoralis*..... 228

CONCLUSION 247

SUMMARY 249

REFERENCES 259

ARABIC SUMMARY