Name of Candidate: Hager Ismail Tolba **Degree**: Ph.D.

Title of Thesis: Biochemical Studies on *Serratia marcescens* for Controlling the Black Cutworm, *Agrotis ipsilon* (Huf.)

Supervisors: **Prof. Dr. Samir Abdel-Monem Ahmed** Prof. of Biochemistry
Prof. Dr. Hussein Mostafa El-Khawas Prof. of Microbiology
Prof. Dr. Samir Ali El-Sayed Prof. of Microbiology
Department: Agricultural Biochemistry **Branch**: Agricultural Biochemistry

Approval : 25 /1 / 2006

ABSTRACT

The effects of microbial agent, *Serratia marcescens* on certain biological and biochemical aspects of the black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Huf.) in comparison with the chitin synthesis inhibitor, Flufenoxuron were studied. The treatments with *S. marcescens* and Flufenoxuron were carried out on the late 6th instar larvae, and the latent effects were investigated on the pupa and adult moth. The results are summarized as follows:

Serratia marcescens grown on chitin as a sole carbon source by secreting chitinase enzyme, *S. marcescens* infected pupa and adult of *A. ipsilon*. *Serratia marcescens* or Flufenoxuron caused a significant decrease in pupation, adult emergence, adult longevity, fecundity and fertility, while, the pupal mortality and adult malformation were significantly increased. Pupal duration was insignificantly changed. Pupal weight was significantly increased after treatment with *S. marcescens*, while, Flufenoxuron significantly decreased the pupal weight. Some morphogenetic effects were recorded. *Serratia marcescens* and Flufenoxuron treatments exhibited significant increase in chitinase activity in pupal stage. While, adult stage showed a significant change. Also, the acid and alkaline phosphatases, AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), amylase, invertase and trehalase activities were significantly changed through the pupal and adult stages as compared to control. But, the total soluble carbohydrate, protein and lipid contents were significantly decreased through the pupal and adult stages. Finally it could be concluded that *S. marcescens* and Flufenoxuron stimulated efforts to use them in combating the population of *A. ipsilon* hoping that the obtained results may be of help in integrated pest management.

Key words: *Serratia marcescens*, Flufenoxuron, *Agrotis ipsilon*, biological and biochemical aspects and enzymes.

S. A. Ismail

نموذج رقم (٤)

اسم الطالبة : **هاجر إسماعيل طلبه** **الدرجة** : **الدكتوراه**

عنوان الرسالة: دراسات كيميائية حيوية على *سيراتيا مارسيسنس* لمكافحة الدودة السوداء القارضة، *اجروتيس ايسيلون* (هوف.)

المشرفون : **ا.د./ سمير عبد المنعم أحمد** (أستاذ الكيمياء الحيوية-كلية الزراعة)

ا.د./ حسين مصطفى الخواص (أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية- كلية الزراعة)

ا.د./ سمير على السيد (رئيس بحوث بقسم الميكروبيولوجيا الزراعية- معهد بحوث الاراضى والمياه والبيئة)

قسم : الكيمياء الحيوية **فرع : الكيمياء الحيوية** تاريخ منح الدرجة : **٢٠٠٦/١/٢٥**

المستخلص العربى

تناولت الدراسة تأثير احد العوامل الميكروبية (بكتيريا *سيراتيا مرسيسنس*) على بعض النواحى البيولوجية والكيميائية الحيوية على الطور اليرقى السادس المتأخر للدودة السوداء القارضة، *أجروتس ايسيلون* (هوف.) بالمقارنة باحد مثبطات تخليق الكيتين (الفلوفينوكسيورون) ودراسة التاثير اللاحق على العذارى والحشرات الكاملة.

ويمكن تلخيص النتائج كما يلى :

مقدرة بكتيريا *سيراتيا مرسيسنس* على النمو على الكيتين كمصدر وحيد للكربون لافرازها انزيم الكيتيز. كما ان لها القدرة على إحداث العدوى لعذارى والحشرات الكاملة *أجروتس ايسيلون*. كما تسببت المعاملة بكتيريا *سيراتيا مرسيسنس* أو الفلوفينوكسيورون فى حدوث انخفاض معنوى فى نسبة تكوين العذارى ونسبة خروج الحشرات الكاملة وفترة حياتها وعدد البيض الذى تضعه الأنثى الواحدة وكذلك نسبة الخصوبة. فى حين حدثت زيادة معنوية فى موت العذارى ونسبة التشوه فى الحشرات الكاملة. ولكن لم يتاثر متوسط عمر العذارى . اما وزن العذارى فحدث به زيادة معنوية نتيجة المعاملة بكتيريا *سيراتيا مرسيسنس* ولكن انخفض نتيجة المعاملة بالفلوفينوكسيرون. كما لوحظ حدوث تشوهاً واضحا فى الحشرات الناتجة بعد المعاملة بكتيريا *سيراتيا مرسيسنس* أو الفلوفينوكسيرون .

تسببت المعاملة بكتيريا *سيراتيا مرسيسنس* أو الفلوفينوكسيورون فى حدوث زيادة معنوية فى نشاط إنزيم الكيتيز فى الطور العذرى. اما الحشرات الكاملة فحدث بها تغيير معنوى . وبالنسبة لإنزيمات الفوسفاتيز الحامضى والقاعدى والاسبرتات ترانس امينيز والالنين ترانس امينيز والاميليز والاتفرتيز والتريهاليز فحدث تغيير معنوى فى نشاطها فى الطور العذرى والحشرات الكاملة . اما المحتوى الكلى الذائب للكربوهيدرات والبروتينات والدهون فحدث له انخفاض معنوى فى الطور العذرى والحشرات الكاملة. ومن كل هذا نلاحظ ان*سيراتيا مرسيسنس* والفلوفينوكسيورون يلعبان دور هام فى خفض تعداد الدودة السوداء القارضة، *أجروتس ايسيلون* (هوف.) املاً أن يكون لهما دور هام فى مجال المكافحة المتكاملة .

كلمات البحث: *سيراتيا مرسيسنس* والفلوفينوكسيورون و *أجروتس ايسيلون* والنواحى البيولوجية والكيميائية الحيوية و الإنزيمات.

CONTENTS

Page

I INTRODUCTION..... 1

II REVIEW OF LITERATURE 3

1. The effects of chitinolytic bacteria on insect..... 3

2. Susceptibility of *Agrotis ipsilon* to microbial agents and insect growth regulators 6

3. Biological effects of biopesticides and insect growth regulators 21

4. Biochemieal effects of biopesticides and inseet growth regulators 29

III MATERIALS AND METHODS 39

1. Materials..... 39

1.1. The used microbial strain 39

1.2. Chitin synthesis inhibitor 39

1.3. The black eutworm, *Agrotis ipsilon* (Huf.) 40

1.4. The used Mierobiologieal media 40

2. Methods 41

2.1. Preparation of baeterial inoculum 41

2.2. Evaluation of dynamic growth of *Serratia marcescens* for producing chitinase enzyme 41

2.3. Toxicological studies 42

2.4. Influenee of *Serratia marcescens* on black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Huf.)..... 42

2.5. Biological studies 43

2.6. Biochemieal determinations 45

2.6.1. Preparation of samples for biochemical analysis 45

2.6.2 Determination of chitinase activity 45
2.6.3. Determination of phosphatase activities..... 46
2.6.3.1 Acid phosphatase activity 46
2.6.3.2 Alkaline phosphatase activity 47
2.6.4. Determination of transaminase activities..... 48
2.6.5. Determination of carbohydrate hydrolyzing enzyme activities 48
2.6.6. Determination of the main metabolites..... 49
2.6.6.1. Total soluble carhohydrate content 50
2.6.6.2. Total soluble protein content 50
2.6.6.3. Total lipid content 51
2.7. Statistical analysis procedure 52
IV RESULTS AND DISSCUSION 53
1. Dynamic growth of *Serratia marcescens* and secretion of chitinase on chitin-containing medium 53
2. Efficiency of *Serratia marcescens* to infect pupal and adult stages of *Agrotis ipsilon* (Huf.)..... 57
3. The susceptibility and biological effects of *Serratia marcescens* on *Agrotis ipsilon* in comparison with Flufenoxuron 62
3.1 Influence on pupal mortality, pupation, adult emergence and malformation percentage 62
3.2. Influence on pupal weight and pupal duration 68
3.3. Influence on adult longevity 72
3.4. Influence on adult weight 75
3.5. Feeundity..... 75
3.6. Fertility 81

3.7. Sterility 84
3.8. Morphogenetic effects..... 88
4. Biochemical effects 94
4.1. Influence on chitinase activity 94
4.2. Influence on phosphatase activities..... 100
4.2.1. Influence on acid phosphatase activity 100
4.2.2 Influence on alkaline phosphatase activity 105
4.3. Influence on transaminase activities..... 111
4.3.1. Influence on aspartate aminotransferase activity 111
4.3.2. Influence on alanine aminotransferase activity 116
4.4. Influence on carbohydrase activities..... 121
4.4.1. Influence on amylase activity..... 121
4.4.2. Influence on invertase activity..... 126
4.4.3. Influence on trehalase activity..... 131
4.5. The main metabolites 137
4.5.1. Influence on total soluble carbohydrate content 137
4.5.2. Influence on total soluble protein content. 143
4.5.3. Influence on total lipid content 148
VI SUMMARY..... 155
VII REFERENCES..... 162
ARABIC SUMMARY .....