ABSTRACT

The efficiency of 15 essential oils as repellent against *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*) nymphs ticks was investigated by laboratory bioassay. The essential oils were obtained by steam distillation (SD) and were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and their major components were identified. The oils exhibited a diversity of activity and were grouped into four categories according to their repellency effect. Volatile oils of *Calendula officinalis*, *Origanum majorana*, *Artemisia judaica*, *Mentha piperita*, *Conyza dioscoridis* and *Rosmarinus officinalis* showed the most pronounced and strong tick repellency effects observed (82 – 100%). Oils of *Ammi majus* and *Foeniculum vulgare* showed very close repellency of about 69% and 70%, respectively. Oils of *Nerium oleander*, *Ricinus Communis.*, *Ammi visnaga*, *Ocimum basilicum* and *Lantana camara* showed very close and moderate repellency of about (60 – 65%). The last category is the oils of *Lawsonia inermis* and *Chamomilla recutita* possessed very weak repellence activity accounted to 58% and 42%, respectively. In a field in Sweden, the tick repellent activity of the highest three oils of *M. piperita*, *C. dioscoridis* and *R. officinalis* were tested by randomised, standardized methodology with concentration half of that used in the Lab., (65mg oil/m²) by cloth-dragging trials. Collected and numbers recorded of *I. ricinus* nymphs ticks differed significantly between treated cloths and the untreated control. Some oils do represent a possible personal protection measure.

The insecticidal value of oil extracts of castor (*Ricinus communis*) seeds prepared using various solvents e.g. hexane, acetonitrile and methanol were studied against the whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) and compared with some formulations based on Azadirachtin (neemix 4.5% EC) and Pyrethrum 5% SC). The crude oils were treated with an emulsifier to facilitate its mix with water. The oils showed insecticidal properties. Mortality of the whitefly, increased with increasing concentrations of castor oil. The lethal dose of the castor oil extracts was less for the immature fly than adult fly. GC/Mass analysis showed that the oils comprised largely of fatty acids and ricinoleic esters content.

Specifications, evaluations and quantifications of *Bacillus thuringiensis* (Bt) as an active ingredient in some microbial control agents currently applied in Egypt were studied using different methodologies by bioassays, electrophoresis and some molecular

techniques (PCR). The bioassays conducted on neonate larvae of cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* based on an artificial diet. The electrphoretic analysis of SDS-Page protein for the samples showed moderate to great differences and similarities between them, depending on the presence and absence of some bands between the samples. Molecular studies by RAPD- PCR technique using six random primers OPA – 01, OPB – 01, OPB – 03, OPC – 01, OPD – 01 and OPD – 03 were used to distinguish any variations or changes between the different strains of these formulations. The studies showed that combination of bioassays, SDS-PAGE and the genetic approach by means of PCR can satisfactory represent evaluations and specifications for the potential of *B. thuringiensis* strains of commercial products.

KEY WORDS: Essential oils, ticks, repellent, toxicity, *Ricinus communis*, *Bemisia tabaci*, *Spodoptera littoralis*, *Bacillus thuringiensis*, Bt formulations, SDS-Page, RAPD- PCR.

المستخلص

تم دراسة استخدام بعض المستخلصات النباتية و بعض المبيدات الحيوية النباتية ضد بعض الآفات الحشرية. كذلك المواصفات الفنية لتقييم بعض المبيدات الميكروبية التي تعتمد في مادتها الفعالة علي بكتريا الباسيليس ثيور نجينسيس (*Bacillus thuringiensis*) المتداولة في مصر في الوقت الحالي باستخدام الاختبارات الحيوية والطرق البيوكيمائية والجزيئية مثل تفاعل البلمرة المتسلسل على الحامض النووي (د. ن. أ.).

. تم تقييم وتقدير عدد خمسة عشر نوعا من الزيوت الاساسية كمواد طاردة ضد قراد اكسودس ريسينس (*Ixodes ricinus* L.) معمليا باستخدام الاختبارات المعتمدة على خاصية صعود هذا القراد لأعلى. تم الحصول على هذه الزيوت بواسطة التقطير البخاري لأجزاء مختلفة من هذه النباتات وتم فصل واستخلاص الزيوت بواسطة بعض المذيبات المختلفة و تحليلها بواسطة أجهزة التحليل الكروماتوجرافى باستخدام جهاز كروماتوجرافي الغاز- الكتلة ومن خلاله تم التعرف على مكونات هذه الزيوت بالمقارنة القياسية مع مكتبة نست بالجهاز. أظهرت الزيوت بتركيز (10مجم /ملى مذيب (هكسان)) كفاءات مختلفة ومتنوعة ضد القراد. ومن ثم تم تقسيم الزيوت إلى أربع مجموعات مختلفة طبقا لهذه الكفاءة وقد ظهر أعلي تأثير من زيوت نباتات الكانديولا(*Calendula officinalis*) والبردقوش (*Origanum majorana*) و الشيح (*Artemisia herba alba*) والنعناع (*Mentha piperita*) والبر نوف (*Conyza dioscoridis*) والروزمارى (*Rosmarinus officinalis*) على الترتيب حيث أظهروا كفاءة وتأثير بنسبه تتراوح بين 82% إلى 100% علي الترتيب . زيوت نباتي الخلة البري (*Ammi majus*) والشمر(*Foeniculum vulgare*) أظهرا كفاءة متقاربة بنسبة 69% و 70% على الترتيب .زيوت نباتات الدفله (*Nerium oleander*) وبذور الخروع (*Ricinus Communis*) والخلة البلدى (*Ammi visnaga*) والريحان (*Ocimum basilicum*) والانتانا (*Lantana camara*) أظهرت كفاءة متوسطة تتراوح بين 60 الى 65% على الترتيب .المجموعة الاخيره لنباتى الحنة (*Lawsonia inermis*) والكاموميل (*Chamomilla recutita*) اظهرا تأثيرا ضعيفا بنسب % 58و 42% على الترتيب. تم تجربة اعلي ثلاثة زيوت من حيث التأثيرالمعملي في احد الحقول بدولة السويد. هذه الزيوت هي زيوت نباتات النعناع والبر نوف والروزمارى.

وتم ذلك بطريقة السحب باستخدام القماش فوق سطح النموات الخضرية للحشائش بالحقل.

تم دراسة سمية الزيوت المستخلصه من بذور نبات الخروع باستخدام مذيبات مختلفة من الهكسان والاسيتوننزيل والمثيانول ثم مقارنتها ببعض المستحضرات التجارية من مواد الازاديراكتين والبيريثرم وذلك ضد الذبابة البيضاء. وتم اضافة بعض المواد الى تساعد على استحلاب هذة الزيوت وذالك لسهولة امتزاجها بالماء مع مراعاة عدم زيادة هذه المواد عن 10% حتى لا توثر على النتائج. نسب الموت في الذبابة البيضاء ارتفعت مع زيادة التركيزات المستخدمة وكانت الجرعة نصف المميتة في الأطوار الأولى اقل منها في الأطوار الكبيرة لليرقات. أظهر مستخلص الميثانول تأثيرا أعلى نسبيا من المذيبات الأخرى التي أظهرت تأثيرا متقاربا مع الميثانول أيضا. اظهر التحليل الكيماوي بواسطة جهاز كروماتوجرافى الغاز احتواء هذه الزيوت على نسبه عاليه من الأحماض الدهنية واسترات الريسينين.

تم دراسة سمية بعض المركبات الميكروبية البكتيرية المتداولة في مصر في الوقت الحاضر ضد دودة ورق القطن اسبودوبترا ليتوراليس لعدد سبع مركبات بكتيرية تجاريه مختلفة السلالات من بكتريا الباسيلس ثيورنجنسيس . بالإضافة إلى الاختبار الحيوي تم استخدام طريقة الفصل الكهربائي لأنماط البروتين وكذلك استخدم الطرق البيولوجية الجزيئية باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل لتقييم هذه المركبات و التفرقة بينهم . و ثبت أن ربط هذه الاختبارات ببعضها ذو كفاءة في ذلك التقييم و تقدير المواصفات.

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION.....	**1**
AIMS AND OBJECTIVES.....	**4**
• **LITERATURE REVIEW**.....	**5**
I – Chemical, Biological and Toxicological Studies.....	**5**
1 – Repellency evaluation of some essential oils against the.....	**5**
hard ticks *Ixodes ricinus* (L.) .	
1.1. - Blood feeding arthropods and ticks	**5**
1. 2. - Ticks life cycle, habitats and behaviors.....	**5**
1. 3.- *Ixodes ricinus (L.)*.....	**6**
1. 4. - Control of ticks.....	**7**
1. 5. -Use of repellents	**8**
1. 5. 1.- Plant-derived natural repellents.....	**8**
1. 5. 2. - Plant-derived natural repellents for *Ixodes ricinus*....	**10**
1.5. 3. - Some Plant-derived natural repellents.....	**11**
1. 5. 4. - Synthetic compounds for dermal application.....	**13**
I. 6.- Mode of action of repellents	**20**
2- Toxicity of bioinsecticides based on Azadirachtin and.....	**22**
Pyrethrum:	
2.1. Azadirachtin.....	**22**
2.1.1 - Mode of actions of azadirachtin	**23**
2.1.2 - Insecticidal effects of azadirachtin.....	**24**
2.2 – Pyrethrum.....	**26**

2.2.1 - Mode of Action..... **27**

2.2.2 - Insecticidal actions of pyrethrum..... **27**

3. Toxicity and Insecticidal Value of Castor *(Ricinus communis)*..... **28**

3.1 - Biological activity against housefly and whitefly..... **28**

3.2 – Against other insects and pests..... **29**

3.3 - Other insecticidal actions of *Ricinus communis*..... **36**

II- Biogical, toxicological and Molecular studies **39**

1. Microbial insecticides based on bacterium *Bacillus thuringiensis*..... **39**

1.1 -What is the Bt..... **39**

1.2 -How Bt works..... **40**

1.3 - Habitats of Bt..... **40**

1.4 - Classification of Bt subspecies..... **41**

1.5 - Insecticidal Toxins produced by *Bacillus thuringiensis*..... **42**

1.6 - Commercial products **44**

2. Historical aspects of the quantification of the active ingredient percentage *bacillus thuringiensis* for products...... **46**

3 - Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS)- PAGE) **48**

3.1- SDS-Protein complexes : A refinement of the model..... **51**

III – Molecular Studies..... **52**

1. polymerase chain reaction (PCR).....

1.1 - PCR-based identification of pesticidal crystal genes..... 52

1.2 -Use of PCR for the prediction of insecticidal activity..... 53

1.3 - Limitations of insecticidal activity prediction by PCR... 54

- **MATERIALS AND METHODS…… 56**

1- Repellency evaluation of some essential oils against ticks.... 56

1.1- Plant oils..... 56

1.2- Identification of compounds..... 56

1.3- Laboratory bioassays (Tick bioassay)..... 57

1.5- Field trial..... 61

1. 6- Statistical analysis..... 63

2.- Toxicity of Azadirachtin , Pyrethrum and *Ricinus*..... *communis* oil against the whitefly (*Bemisia tabaci*) **64**

2. 1. Laboratory strain…..... 64

2. 2. Bioassay 65

2. 3. Commercial botanical formulations used: 65

3. Biological, toxicological and molecular biology studies of Bt formulations 66

3.1 -Biology and collection of *Spodoptera littoralis* (Boisd)…… 66

3.2. Bt formulations used..... 69

3.3. SDS-polyacrylamide gel 76

3.3.1.Molecular characterization..... 79

3.4. RAPD – PCR..... 82

- **PRESENT INVESTIGATIONS & EXPERIMENTAL RESULTS** 87

1 – Repellency evaluation of some essential oils against the hard ticks *Ixodes ricinus* (L.) 87

2. Toxicity of Azadirachtin , Pyrethrum and *Ricinus communis* oil against the whitefly (*Bemisia tabaci*). 114

3. Biological, toxicological and molecular biology studies of Bt formulations ... 118

3.1. Toxicological of Bt formulations… 118

3.2. Microscopic examinations 120

3.3. Seperation of protein patterns using SDS-PAGE 122

3.4. Molecular studies 132

3.4.1. Primer OPA-01 132

3.4.2. Primer OPB-01 133

3.4.3.Primer OPB-03 134

3.4.4. Primer OPC-01 135

3.4.5. Primer OPD-01 136

3.4.6. Primer OPD-03 137

- **DISCUSSION AND CONCLUSIONS** 142

I. Biological, chemical and toxicological studies: 142

1. Repellency evaluation of essential oils 142

II. Toxicology of castor oil against the whitefly *Bemisia tabaci* 155

III. insecticidal activity of the bacterial formulations..... 157

Molecular studies (PCR)..... 167

SUMMARY..... 170

LITERATURE CITED..... 177

APPENDIXES..... 203

Appendix (1):Essential oils repellency calculations..... 203

Appendix (2): field trials..... 236

Appendix (3): Essential oils major products with their..... 240 GC/Ms Retention time (Rt) and area %.

Appendix (4): mortality percentage % and concentrations for castor oils and the botanical commercial products 248

Appendix (5): Concentrations and mortalities for Bt…….. 258 samples

Appendix (6): Amplified fragments sizes resulting from PCR performed with the Bt samples strains. 261

LIST OF ABBREVIATIONS

ANOVA	Analysis of variance
Aprox.	Aproximately
BHC	Benzene hexachloride
Bt	*Bacillus thuringiensis*
Conc.	Concentration
DEPA	Di-ethyl phenyl Acetamide
2-D	Two dimensions
DF	Dry flowable
DDT	Dichloro-diphenyl-trichloroethane
ED50	Effective dose
EC	Emulsifiable concentrate
e.g.	Abbreviation of Latin Exempli Gratia**,** for example
ES	Oil-based emulsifiable suspension
FC	Water-based flowable concentrate
EPA	Environmental Protection Agency
Fig.	Figure (s)
G/L	Gram **/** litter.
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
HP	High potency

Hrs	Hours
I. ricinus	*Ixodidae ricinus*
ICP	Insecticidal crystal protein
IGR	Insect growth regulator
IU	International unit
Lab	Laboratory
LC	Lethal Concentration
MJ	Methyl Jasmonate
Mr	Molecular weight
MPCA	microbial pest control agent
NTO	non-target organism
OF	Oil flowable
PBO	Pipronyl Butoxide
PCR	polymerase chain reaction
PMD	Para-menthane-3,8 diol
PPM	Part per million
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
RH	Relative humidity
S. littoralis	*Spodoptera littoralis*
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Soln (s)	Solution(s)
SC	Suspension concentrate
SU	*Spodoptera* unit
W/W	Weight/ weight
WHO	World Health Organisation
WG or WDG	Water dispersible granules
WP	Wettable powder
TBE	Tick borne encephalitis
%	Percentage