Name of Candidate: Sahar Sayed Ali **Degree:** Ph.D.

Title of Thesis: Effects of four entomopathogenic fungi isolates on larvae of the sugar beet worm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

Supervisors: Dr. Monir Mohamed El-Husseini
Dr. Esam Abdel Megeed Agamy
Dr. Hassan Kassem Bekhiet

Department: Economic Entomology and Pesticides

Branch: Economic Entomology **Approval:** / /

ABSTRACT

This study was conducted to clear the difference in virulence among four fungi isolates . (Two isolates of *Metarhizium anisopliae,* M1 & M2, and another two isolates of *Beauveria bassiana*, B1 & B2 were isolated from soil and dead insects.

The most important results could be summarized as follows:

Variation in quantity of spores produced was studied on different solid media; grains media , rice, wheat, maize and soybean produced conidia and Czapek Dox Agar medium with small glass balls, (CzDA+b.) and CZA medium as the control for comparison.

Temperature of 25°C was found optimum. It gave maximum production of spores for all isolates. M1 produced the highest amount of conidia (11.2×10^9 spore / plate) on (CzDA+b.) ,M2 gave 10.09×10^9 spore / plate on the same medium, B1 produced 1.92×10^9 spore / plate and B2 gave 2.02×10^9 spore / plate.

The isolate M1(*M. anisopliae*) was the most effective against *S. exigua* 3rd instar larvae. M1 at high concentration (1.0×10^9) achieved 87.0 % mortality within 5.6 ± 1.9 days. The highest effective toxin was produced by *M. anisopliae* (M1) inducing mortality percentage of 92.15% .

The maximum activity of enzymes was recorded in M1; chitinolytic activity(0.597µg NAGA/min./ml) . In case of protease, M1 recorded the greatest activity (1017.0 O.D. unit $\times 10^3$ / hr./ml). The same trend in the activity pattern was obtained for lipase (42.980 U/ml).

Complete extraction of destruxins from the crude toxins of *M. anisopliae* isolates showed that M1 contained the molecular weights of destruxins A,B and D, M2 contained the molecular weights of dex. D ,B and cytochalasin A.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, Isolation, Selective media, Enzymes activity, Destruxins, *Spodoptera exigua*

اسم الطالب: سحر سيد علي **الدرجة:** دكتوراه الفلسفة

عنوان الرسالة: تأثير أربع عزلات للفطريات الممرضة للحشرات علي يرقات دودة البنجر *Spodoptera exigua* (Hübner)

المشرفون : دكتور: منير محمد محمد الحسيني
دكتور: عصام عبد المجيد عجمي
دكتور: حسن قاسم بخيت

قسم:الحشرات الاقتصادية والمبيدات **فرع:** الحشرات الاقتصادية **تاريخ منح الدرجة:** / /

المستخلص العربي

الهدف الرئيسي لهذا البحث هو دراسة الإختلافات في شدة الإصابة بين العزلات الفطرية الأربعه التي تم عزلها محليا من خلال دراسة نشاط بعض إنزيمات الفطر المفرزة معملياوكذلك دراسة التأثير المميت للتوكسينات المفرزة للعزلات علي حشرة دودة البنجر. تم عزل وتعريف أربع عزلات فطرية ممرضة للحشرات (عزلتان M١وM٢ لفطر *Metarhizium anisopliae* و عزلتان B١ و B٢ لفطر *Beauveria bassiana*) باستخدام البيئات الانتقائية ودراسة تأثير مادة الدوداين علي نمو الفطريات. تم إكثار الفطريات للحصول علي الجراثيم الكونيدية لعمل التجارب المعملية بإستخدام بيئة الدوكس Czapek Dox (CZ) medium و الأرز والقمح والذرة وفول الصويا، وكذلك تم إستخدام بيئة Dox بعد ملئ الطبق البتري بكرات زجاجية صغيرة معقمة وذلك لزيادة مسطح البيئة، أيضا تم دراسة تأثير درجات حرارة التحضين وكانت أفضل درجة حرارة لكل العزلات هي ٢٥ درجة مئوية، وقد أعطت العزلات أعلي نمو لها عند هذه الدرجة وفي بيئة الدوكس الموجود بها كرات زجاجية وأعطت M١ ١١.٢ x ١٠^{٩} جرثومة للطبق والعزلة M٢ ١٠.٠٩ x ١٠^{٩}جرثومة للطبق و B١ ١.٩٢ x ١٠^{٩}, B٢ أعطت ٢.٠٢ x ١٠^{٩} جرثومة للطبق وقد تبين مدي تحمل عزلات فطر *M. anisopliae* للأرتفاع في درجات الحرارة بالمقارنة بعزلات فطر *B. bassiana* .تم إجراء الإختبارات الحيوية لمعرفة شدة إصابة العزلات الفطرية معمليا علي يرقات دودة ورق القطن الصغري بإستخدام الجراثيم، وكانت العزلة M١ هي أقوي العزلات وبلغت نسبة موت اليرقات ٨٧% وكذلك كانت النتائج متوافقة في تاثير السموم المفرزة لهذه العزلة علي يرقات دودة البنجر فقد اعطت نسبة موت بلغت ٩٢.١٥% وهي أعلي نسبة موت مقارنة بباقي العزلات . تمت مقارنة درجات نشاط كل من انزيم الكيتينيز والبروتيز والليبيز لكل عزلة وقد اعطت العزلة M١ أعلي درجات نشاط لكل انزيم، ففي إنزيم الكيتينيز كانت (ml/min./µgNAGA٠.٥٩٧) وكانت الدرجة الاعلي لنشاط البروتيز (O.D.١٠١٧.٠) وكذلك الليبيز (U/ml ٤٢.٩٨٠). وأخيرا تم استخلاص التوكسينات الخاصة بعزلتي فطر *M.anisopliae* وتعريفهما باستخدام جهاز HPLC-ESI ، واتضح إحتواء العزلة M١ علي الأوزان الجزيئية لدستروكسين A,B,D واحتواء العزلة M٢ علي الاوزان الجزيئية لدستروكسينD,B والسيتوكلاسين A . و نستخلص من ذلك ان العزلةM١ تعتبر أقوي العزلات المختبرة وأكثرهم إمراضا ليرقات دودة البنجر.

الكلمات الدالة: الفطريات , العزل، البيئات الانتقائية، دودة البنجر ، النشاط الانزيمي

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION	**1**
REVIEW OF LITERATURE	**5**
1.Isolation of entomopathogenic fungi	**5**
2.Conidial production of entomopathogenic fungi	**9**
3. Virulence of entomopathogenic fungi against the beet army worm *Spodoptera exigua*	**18**
4. Enzymes activity of entomopathogenic fungi	**24**
5. Production and extraction of fungal toxins	**34**
a . Toxins of *B. bassiana*	**34**
b. Toxins of *M. anisopliae*	**38**
6. Virulence of toxins in crude extraction	**45**
MATERIALS AND METHODS	**50**
1 .The isolates of fungi	**50**
a.Isolation from insects	**50**
b.Isolation from soil	**51**
c. Selective media	**52**
2. Laboratory production of conidiospores isolates and effects of temperature	**53**
3. Rearing of *S. exigua*	**53**
4. Bioassay	**54**
5. Enzymes activity	**55**
a . Conditions of enzyme production	**55**
b. Statistical analysis	**57**
6.Toxins released	**57**

a. *In vitro* production of crude toxins from *B. bassiana* isolates …..... **57**

b. *In vitro* production of crude toxins from *M. anisopliae* isolates …..... **58**

c. Virulence of isolated entomopathogenic fungi by crude of toxins..... **58**

7.Extraction and analyses of destruxins from the crude toxins of *M. anisopliae* isolates ……..… **58**

RESULTS AND DISCUSSION……..... **60**

1.Determination of selective medium…… **60**

2.Laboratory production of conidiospores and effect of incubation temperature……...…… **62**

a. Production of conidia on different solid media at 15°C **62**

b. Production of conidia on different solid media at 20°C **64**

c. Production of conidia on different solid media at 25°C **64**

d. Production of conidia on different solid media at 30°C **65**

e. Production of conidia on different solid media at 35°C **66**

3.Virulence of isolates of fungi by bioassay..... **70**

4. Enzymes activity…..... **76**

5.Virulence of toxins crude extracts **81**

6.Extraction and analyses of destruxins from the crude toxins of *M. anisopliae* isolates ……... **87**

SUMMARY…… **90**

REFERENCES ……..…… **94**

ARABIC SUMMARY ……..……