

**ECOLOGICAL AND MOLECULAR STUDIES ON
LIMA BEAN POD BORER, *Etiella zinckenella*, Treit.
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) IN RELATION TO ITS
HOST PLANTS**

By

MAGDA HASHIM MANSOUR

B.Sc. Agri. Sci. (Pesticides), Fac. Agric., Cairo Univ., 2008

THESIS

**Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree of**

MASTER OF SCIENCES

In

**Agricultural Sciences
(Economic Entomology)**

**Department of Economic Entomology and Pesticides
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT**

2014

APPROVAL SHEET

**ECOLOGICAL AND MOLECULAR STUDIES ON
LIMA BEAN POD BORER, *Etiella zinckenella*, Treit.
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) IN RELATION TO ITS
HOST PLANTS**

**M.Sc. Thesis
In**

Agric. Sci. (Economic Entomology)

By

**MAGDA HASHIM MANSOUR
B.Sc. (Pesticides), Fac. Agric., Cairo Univ., 2008**

APPROVAL COMMITTEE

Dr. Ismail Abd El Khalek Ismail.....
Researcher Professor of Pests and Plant Protection, National Research Center

Dr. Ramadan Abd El Kader Salama.....
Professor of Economic Entomology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. Khaled El- Sayed Ali Abdel-Ati.....
Professor of Vegetable Crops, Fac. Agric., Cairo University

Dr. Ez El-Din Abd El Samea El-Shazly.....
Professor of Economic Entomology, Fac. Agric., Cairo University

Date: / /2014

SUPERVISION SHEET

**ECOLOGICAL AND MOLECULAR STUDIES ON
LIMA BEAN POD BORER, *Etiella zinckenella*, Treit.
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) IN RELATION TO ITS
HOST PLANTS**

M.SC. Thesis

In

Agri. Sci. (Economic Entomology)

By

MAGDA HASHIM MANSOUR

B.Sc. (Pesticides), Fac. Agric., Cairo Univ., 2008

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. Ez El-Din Abd El Samea El-Shazly

Professor of Economic Entomology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. Khaled El- Sayed Ali Abdel-Ati

Professor of Vegetable Crops, Fac. Agric., Cairo University

Dr. Homam Bekheet Homam

Head Research, Plant Protection Research Institute, ARC

دراسات بيئية وبيولوجية جزيئية على دودة قرون اللوبيا وعلاقتها ببعض أصناف عوائلها النباتية

رسالة مقدمة من

ماجده هاشم منصور

بكالوريوس في العلوم الزراعية (مبيدات)، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، ٢٠٠٨

للحصول على درجة

الماجستير

في

العلوم الزراعية
(حشرات اقتصادية)

قسم الحشرات الاقتصادية والمبيدات
كلية الزراعة
جامعة القاهرة
مصر

٢٠١٤

دراسات بيئية وبيولوجية جزيئية على دودة قرون اللوبيا وعلاقتها ببعض أصناف عوائلها النباتية

رسالة ماجستير
فى العلوم الزراعية
(حشرات اقتصادية)

مقدمة من

ماجده هاشم منصور

بكالوريوس فى العلوم الزراعية (مبيدات)، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، ٢٠٠٨

لجنة الحكم

دكتور/ إسماعيل عبد الخالق إسماعيل
أستاذ باحث الآفات ووقاية النبات، المركز القومي للبحوث

دكتور/ رمضان عبد القادر سلامه
أستاذ الحشرات الاقتصادية، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

دكتور/ خالد السيد على عبد العاطى
أستاذ الخضر، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

دكتور/ عز الدين عبد السميع الشاذلى
أستاذ الحشرات الاقتصادية، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

التاريخ: / / ٢٠١٤

دراسات بيئية وبيولوجية جزيئية على دودة قرون اللوبيا وعلاقتها ببعض أصناف عوائلها النباتية

رسالة ماجستير
في العلوم الزراعية
(حشرات اقتصادية)

مقدمة من

ماجده هاشم منصور

بكالوريوس في العلوم الزراعية (مبيدات)، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، ٢٠٠٨

لجنة الإشراف

دكتور/ عز الدين عبد السميع الشاذلي
أستاذ الحشرات الاقتصادية، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

دكتور/ خالد السيد علي عبد العاطي
أستاذ الخضر، كلية الزراعة، جامعة القاهرة

دكتور/ همام بخيت همام
رئيس بحوث، معهد بحوث وقاية النباتات، مركز البحوث الزراعية

DEDICATION

I dedicate this work to my mother for her patience, help and support throughout the whole period of conducting the current study and also to my father.

Acknowledgments

First of all, ultimate thanks to ALLAH who has enabled me to overcome all the difficulties which faced me throughout my work, I would like to express my deep appreciation and gratitude to Dr. E. A. El-Shazly, Professor of Economic Entomology, Faculty of Agriculture, Cairo University, for his continuous assistance and guidance, helpful supervision and encouragement throughout the whole course of the study.

I would also like to express my deep appreciation and gratitude to Dr. K. E. Abdel-Ati, Professor of Vegetable Crops, Faculty of Agriculture, Cairo University, for supervising the current work, encouragement and critical revising of the manuscript.

The author expresses her deep thanks to Dr. H. B. Homam, Head Research of Vegetable Pests, Plant Protection Research Institute, for providing all the facilities needed for the work, kind feelings and faithful supervision, encouragement and revising the manuscript.

The author expresses her deep thanks to their family, my brothers, sister and brother's wife.

Thanks are also due to colleagues and staff members of the Vegetable Pests Department, Plant Protection Research Institute, Agriculture Research Center for various helps.

اسم الطالب: ماجده هاشم منصور
عنوان الرسالة: دراسات بيئية وبيولوجية جزيئية على دودة قرون اللوبيا وعلاقتها ببعض أصناف
عوائلها النباتية
المشرفون: دكتور: عز الدين عبد السميع الشاذلي
دكتور: خالد السيد على
دكتور: همام بخيت همام
قسم: الحشرات الاقتصادية والمبيدات فرع: الحشرات الاقتصادية
تاريخ منح الدرجة: ٢٠١٤/٦/٤

المستخلص العربي

يهدف هذا العمل إلى دراسة وشرح إصابة بعض أصناف الفاصوليا واللوبيا وفول الصويا للإصابة بحشرة دودة قرون اللوبيا من خلال تحليل بروتين بذور الأصناف المختبرة باستخدام تقنية التفريد الكهربى للبروتين بطريقتي PAGE و SDS-PAGE ومحاولة معرفة الاختلافات الوراثية RAPD Marker بين عشائر فراشة قرون اللوبيا وفراشات كل من فراشه دقيق البحر الابيض المتوسط وفراشة الشمع الكبيرة وفراشة الشمع الصغيرة ويمكن تلخيص النتائج فى الآتى:

وجدت زيادتين عديتين، واحدة على الفاصوليا وواحدة على كل من اللوبيا وفول الصويا. ووضحت النتائج ان اصناف فول الصويا تصاب مبكرا بيرقات دودة قرون اللوبيا. ورتبت الاصناف تصاعدياً تبعاً لمتوسط الإصابة بيرقات دودة قرون اللوبيا والنسبة المئوية للقرون المصابة على النحو الآتى: أصناف الفاصوليا (Diacol < Gourl < Borrollotto < Bronco < Nebraska < Paulista) 331 < Dokki 1 < Kafr El Shiek 7 < Cream 1 < Kaha 1) أصناف فول الصويا (Giza 82 < Crawford < Giza 83 < Giza 111). أنتج الصنف جورل اعلى محصول اخضر للقرون خلال موسمى الدراسة وانتج الصنف دايكول اعلى محصول للبذور للفاصوليا. وانتج صنف اللوبيا كريم ٧ اعلى محصول وصنف فول الصويا جيزة ٨٢ اعلى محصول. فصلت البروتينات البسيطة، الليبوبروتين والجليكوبروتين لاصناف الفاصوليا، اللوبيا وفول الصويا الى حزم مختلفة طبقاً للمسافة التى تتحركها الحزم. وجد أن الأصناف برونكو ، بوليسا، نبراسكا تصاب بدودة قرون اللوبيا. وهذه الاصناف تحتوى على الحزمة رقم ٢٩ فى طور النضج و طور الحصاد للبذور. وهذا يوضح اهمية هذه الحزمة لتغذية يرقات دودة قرون اللوبيا. اوضحت بصمة البروتينات المفككة عدم وجود حزم فى البراز الناتج من يرقات دودة قرون اللوبيا التى تتغذى على الطور الناضج من البذور. ولوحظ أن يرقات دودة قرون اللوبيا لا تتغذى على طور حصاد البذور لفول الصويا وهذا يعنى ان اليرقات لا تتغذى على البروتين الموجود فى طور حصاد البذور ولكن يرقات دودة قرون اللوبيا تحول وتغير بعض البروتينات الموجودة فى طور عدم النضج والنضج للبذور الى بروتينات لها نفس الوزن الجزيئي توجد فى طور حصاد بذور فول الصويا. توجد بعض الحزم لفراشات قرون اللوبيا لا ترجع الى مصدر التغذية او المحافظة. وجدت ٢٤ حزمة بروتينية مشتركة بين عينة الذكر والانثى لفراشة قرون اللوبيا، الحزمة المتبقية ترجع الى النوع الجنسى. تعتبر هذه الدراسة الاولى فى مجال الجينات الوراثية لفراشة قرون اللوبيا فى مصر. وقسمت الشجرة الوراثية ل ١٠ عشائر لذكور فراشة قرون اللوبيا المجموعة من ١٠ محافظات والذكور والاناث لكل من فراشة دقيق البحر الابيض المتوسط وفراشة الشمع الكبيرة وفراشة الشمع الصغيرة حيث قسمت الى مجموعتين. اظهرت الشجرة الوراثية ان الجد لذكور فراشة قرون اللوبيا عند المسافة ١٧ المجموعة من الجيزة هو المصدر لكل العينات.

الكلمات الدالة: الإصابة، المحصول، فراشة قرون اللوبيا، فراشة دقيق البحر الابيض المتوسط، فراشة الشمع الكبيرة، فراشة الشمع الصغيرة، APGE، SDS-PAGE، RAPD-PCR، الشجرة الوراثية.

Name of Candidate: Magda Hashim Mansour **Degree:** M.Sc.

Title of Thesis: Ecological and Molecular Studies on Lima Bean
Pod Borer, *Etiella zinckenella* Treit. (Lepidoptera:
Pyralidae) in Relation to its Host Plants

Supervisors: Dr.Ez El-Din Abd El Samea El-Shazly
Dr.Khaled El- Sayed Ali Abdel-Ati
Dr. Homam Bekheet Homam

Department: Economic Entomology and Pesticides

Branch: Economic Entomology

Approval: 4 / 6 / 2014

ABSTRACT

This work was conducted to study and explain the infestation levels of common bean, cowpea and soybean cultivars by *Etiella zinckenella* larvae through analysis of seed protein of tested cultivars of common bean, cowpea and soybean by Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE). The study aimed to explore the level of genetic variation among the populations of *E. zinckenella* by RAPD markers and The RAPD-PCR fingerprints of *Ephestia kuhniella*, *Galleria mellonella* and *Achroia grisella*. Results indicated the following: There were 2, 1 and 1 peaks of *E. zinckenella* on the common bean, cowpea and soybean varieties, respectively. Soybean varieties were infested earlier. The ascending arrangement of the tested varieties according to the mean numbers of *E. zinckenella* larval infestation and percentages of damage pods was as follows: (Diacol and Gourel < Borrolotto < Bronco < Nebraska < Pulista), (Kaha1 < Cream 7 < Kfar-El Sheikh 1 < Dokki 331) and (Giza 82 < Crawford < Giza 83 < Giza111) for common bean, cowpea and soybean varieties, respectively. Gourel variety produced the heaviest green yield of pods and Diacol variety produced the heaviest dry yield of common bean seeds. Cowpea variety Cream7 and soybean variety Giza 82 produced the highest yield. The general proteins, lipoprotein and glycoprotein of the tested common bean, cowpea and soybean varieties were separated in different bands according to their relative mobility. Bronco, Pulista and Nebraska were infested by *E. zinckenella* larvae. The previous varieties have band no. (29) in the mature stage of seeds or harvest mature stages of seeds. The SDS-PAGE showed that, no protein bands appeared in the faeces of *E. zinckenella* larvae. The *E. zinckenella* larvae do not feed on the protein composition of harvest mature stage of seeds, but *E. zinckenella* larvae change and convert some protein bands in the immature and mature stages of soybean protein seeds to the same molecular weight of some bands in harvest mature stage of seeds protein. There are specific bands for *E. zinckenella* according to the diverse feeding host and locality. There were 24 common bands that appeared in male and female samples of *E. zinckenella*. Hence the rest of the bands are referring to sex. This is the first study on the genetic diversity by DNA-PCR of *E. zinckenella* in Egypt. The dendrogram illustrated that, the ten populations of *E. zinckenella* male and dual sex of *E. zinckenella*, *E. kuhniella*, *G. mellonella* and *A. grisella*, were divided into two main groups. The ancestor of *E. zinckenella* male (the linkage distance is at 17) collected from Giza is the source of all collected populations.

Key words: Infestation, yield, *Etiella zinckenella*, *Ephestia kuhniella*, *Galleria mellonella* and *Achroia grisella*, PAGE, SDS-PAGE, RAPD-PCR, dendrogram.

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION.....	1
REVIEW OF LITERATURE.....	5
1. Field studies.....	5
2. Biochemical studies.....	9
3. Molecular studies.....	16
MATERIALS AND METHODS.....	19
1. Field studies.....	19
a. The population fluctuations of <i>E. zinckenella</i> on common bean, cowpea and soybean.....	19
b. Damage %.....	19
c. Yield.....	19
2. Biochemical analysis.....	20
1. Polyacrylamide Gel Electrophoresis.....	21
Preparation of plant seeds sample for analysis.....	22
Procedure.....	22
2. Refractionation of protein bands by SDS-PAGE.....	23
Preparation of gel.....	23
Reagents.....	23
Treatment buffer (2X).....	23
Electrode buffer solution.....	23
Staining solution.....	24
Destaining solution.....	24
Preparation of samples.....	24
A. Insect sample.....	24
B. Plant seeds samples.....	24
Preparation of SDS-PAGE.....	25
A. 14% SDS-PAGE.....	25
B. 15% SDS-PAGE.....	25
Procedure.....	25
Determination of molecular weights of proteins.....	25
Calculation of the relative mobility (Rm.) of protein band....	26
3. Molecular biology studies.....	26
DNA isolation.....	26
RAPD-PCR conditions.....	26
Selected primers.....	26
PCR components.....	27

CONTENTS

	Page
Temperature profiles.....	27
Agarose gel electrophoresis.....	28
4. Data analysis.....	28
Results.....	29
1. Field studies.....	29
a. Population fluctuations of <i>E. zinckenella</i> larvae.....	29
Common bean varieties.....	29
Cowpea varieties.....	32
Soybean varieties.....	35
b. Damage % with <i>E. zinckenella</i> larvae on the pods of common bean, cowpea and soybean varieties collectively	38
c. Yield.....	41
Common bean.....	41
Cowpea.....	42
Soybean.....	42
2. Biochemical studies.....	43
a. Common bean.....	43
Simple protein patterns.....	43
Lipoprotein patterns.....	44
Glycoprotein patterns.....	45
Lipoglycoprotien.....	45
b. Cowpea.....	49
Simple protein patterns.....	49
Lipoproteinpatterns.....	49
Glycoprotein patterns.....	50
Lipoglycoprotien.....	50
c. Soybean.....	54
Simple protein patterns.....	54
Lipoprotein patterns.....	54
Glycoprotein patterns.....	55
Lipoglycoprotien.....	56
3. Refraction of protein patterns.....	60
a. SDS-PAGE of tested common bean varieties at its different developmental stages of seed maturation.....	60

CONTENTS

	Page
b. SDS-PAGE fingerprints of the developmental stages of cowpea seeds as well as the faeces of <i>E. zinckenella</i> larva on the four tested varieties.....	71
c. SDS fingerprints of the developmental stages of soybean seeds as well as the faeces of <i>E. zinckenella</i> larva on the tested four varieties.....	82
d. SDS-PAGE refractionation of protein pattern of <i>E. zinckenella</i> adults.....	99
e. SDS-PAGE refractionation of protein patterns in <i>E. zinckenella</i> male and female population samples.....	108
4. Molecular studies.....	113
OPK-13, OPB -20 and OPH-9 prime.....	116
OPK-13 Primer.....	116
OPB-20 Primer.....	120
OPH-9 Primer.....	123
Primers OPB-5, OPC-3 and OPB-14.....	126
OPB-5 Primer.....	126
OPC-3 Primer.....	130
OPB-14 Primer.....	133
OPJ-15 Primer.....	136
OPJ-13 Primer.....	139
OPG-16 is Positive PCR product for dual sex of <i>E. zinckenella</i> , <i>E. kuhniella</i> , <i>G. mellonella</i> and <i>A. grisella</i>	142
5. Cluster analysis of <i>E. zinckenella</i>, <i>E. kuhniella</i>, <i>G. mellonella</i> and <i>A. grisella</i>.....	149
Discussion.....	152
Conclusion.....	177
Summary.....	179
References.....	187
List of Abbreviations.....	209
Arabic summary.....	

LIST OF TABLES

No.	Title	Page
1	The nucleotide sequences of the primers used for RAPD-PCR analysis.....	27
2.	Weekly population fluctuations of <i>E. zinckenella</i> larvae on six common bean varieties at Kaha region, Qualubia Governorate during 2010 summer season.....	30
3.	Weekly population fluctuations of <i>E. zinckenella</i> larvae on six common bean varieties at Kaha reigon, Qualubia Governorate during 2011 summer season...	31
4.	Weekly population fluctuations of <i>E. zinckenella</i> larvae on four cowpea varieties at Kaha region, Qualubia Governorate during 2010 summer season....	33
5.	Weekly population fluctuation of <i>E. zinckenella</i> larvae on four cowpea varieties during 2011summer seasons at Kaha region, Qualubia Governorate.....	34
6.	Weekly population fluctuations of <i>E. zinckenella</i> larvae on four soybean varieties at Kaha region, Qualubia Governorate during 2010 autumn season.....	36
7.	Weekly population fluctuation of <i>E. zinckenella</i> larvae on four soybean varieties at Kaha region, Qualubia Governorate during 2011 autumn season.....	37
8.	Mean numbers of <i>E. zinckenella</i> larvae and percentages of pods damage on common bean varieties at Kaha region, Qualubia Governorate during the summer seasons of 2010 and 2011.....	39
9.	Mean numbers of <i>E. zinckenella</i> larvae and percentages of pods damage on cowpea varieties at Kaha region, Qualubia Governorate during summer seasons of 2010 and 2011.....	40
10.	Mean numbers of <i>E. zinckenella</i> larvae and percentages of pods damage of soybean varieties at Kaha region Qualubia Governorate during summer seasons 2010 and 2011.....	40
11.	Mean weights of green pods yield (kg/plot) of tested green common bean varieties at Kaha region, Qualubia Governorate during the 2 summer seasons of 2010 and 2011.....	41

LIST OF TABLES

No.	Title	Page
12	Mean weights of dry seeds yield (kg/plot) of tested dry common bean varieties at Kaha region, Qualubia Governorate during the 2 summer seasons of 2010 and 2011.....	42
13	Mean weight of dry seeds yield (kg/plot) of cowpea varieties at Kaha region, Qualubia Governorate during two summer seasons of 2010 and 2011.....	42
14.	Mean weights of dry seeds yield (kg/plot) of soybean varieties at Kaha region, Qualubia Governorate during the 2 autumn seasons of 2010 and 2011.....	43
15a.	Behaviour of protein band patterns and its Rm. values as detected from the seeds of the 6 tested common bean seeds varieties.....	46
15b.	Type of protein band patterns and its Rm. values as detected from the seeds of the 6 tested common bean seeds varieties.....	47
16a.	Behaviour of protein band patterns and its Rm. values as detected from the seeds of the 4 tested cowpea seeds varieties.....	51
16b.	Type of protein band patterns and its Rm. values as detected from the seeds of the 4 tested cowpea seeds varieties.....	52
17a.	Behaviour of protein band patterns and its Rm. values as detected from the seeds of the 4 tested soybean seeds varieties.....	57
17b.	Type of protein band patterns and its Rm. values as detected from the seeds of the 4 tested soybean seeds varieties.....	58
18.	Rm. values and molecular weights of SDS protein bands as detected from the common bean varieties with non-colored seeds.....	64
19.	Rm. values and molecular weights of SDS protein bands as detected from the 2 common bean varieties with color seeds.....	67