{وَقُلِ اعْمَلُواْ فَسَيَرَى اللّهُ عَمَلَكُمْ

وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ }

صدق الله العظيم

قسم علم الحيوان
كلية العلوم
جامعة عين شمس

رسالة دكتوراه الفلسفة في العلوم في علم الحيوان

اسم الطالب : نرمين محمود محمد قنديل
عنوان الرسالة : دراسات جزيئية وبيوكيميائية على نيماتودا البزاقات وكفاءتها كعنصر مكافحة حيوية
اسم الدرجة : دكتوراه الفلسفة في علم الحيوان.

لجنة الإشراف :

أ.د / عبد الله محمد ابراهيم استاذ علم اللافقاريات كلية العلوم – جامعة عين شمس
أ.د / مجدي محمود محمد استاذ الكيمياء الحيوية كلية العلوم – جامعة عين شمس
أ.د/ مجدي ولسن بولس استاذ علم الحيوانات الضار بالزراعه – معهد بحوث وقاية النباتات مركز البحوث الزراعية
أ.د/ منى أحمد حسين أستاذ دكتور علم النيماتولوجي والحشرات قسم افات وقاية النبات – المركز القومي للبحوث.
أ.د / سعد محمد موسى أستاذ علم البيوتكنولجي – حشرات معهد بحوث وقاية النباتات.

لجنة الحكم :

أ.د / فتحي عبد العاطي عبد الغفار أستاذ البا راسيتولوجي كلية العلوم جامعة القاهرة
أ.د/ وجدي خليل بسالي خليل أستاذ البيولوجيا الجزئية – المركز القومي للبحوث
أ.د / عبد الله محمد ابراهيم استاذ علم اللافقاريات كلية العلوم – جامعة عين شمس
أ.د / مجدي محمود محمد استاذ الكيمياء الحيوية كلية العلوم – جامعة عين شمس

الدراسات العليا :

ختم الإجازة	**أجيزت الرسالة بتاريخ**
/ / ٢٠٢٠	**/ / ٢٠٢٠**
موافقة مجلس الكلية	**موافقة مجلس الجامعة**
/ / ٢٠٢٠	**/ / ٢٠٢٠**

MOLECULAR AND BIOCHEMICAL STUDIES ON SLUG- PARASITIC NEMATODES AND ThEIR POTENTIAL AS BIOCONTROL AGENT

A Thesis

Submitted to the Faculty of Science, Ain Shams University

For Ph.D. in Zoology

By

Nermeen Mahmoud Mohamed Kandeel

B.Sc. in Zoology, Cairo Univ. (1994)

M. Sc. In Zoology, Cairo Univ. (2004)

Supervisors

Dr. Abdallah Mohamed Ibrahim
Professor of Invertebrates.
Department of Zoology
Science, Ain Shams Universty.

Dr. Magdy Mahmoud Mohamed
Professor of Biochemistry
Department of Biochemistry
Science, Ain Shams University

Dr. Magdy Wilson Boles
Professor of Harmful Animals
Plant Protection Research Institute.
Agriculture Research center.

Dr. Mona Ahmed Hussein
Professor of Nematology and Entomology
National Rsearch Center

Dr. Saad Mohamed Moussa
Professor Of Biotechnology of Insects
Plant Protection Research Center
Agriculture Research center

دراسات جزيئية وبيوكيميائية على نيماتودا البزاقات وكفاءتها كعنصر مكافحة حيوية

رسالة مقدمة

للحصول على درجة دكتوراه الفلسفه فى العلوم

فى علم الحيوان (فسيولوجى)

من

نرمين محمود محمد قنديل

بكالوريوس علوم قسم علم الحيوان- جامعة القاهرة ١٩٩٤

ماجستير فى علم الحيوان – جامعة القاهرة ٢٠٠٤

تحت اشراف

أ.د/ عبدالله محمد ابراهيم
استاذ علم اللافقاريات
كلية العلوم- جامعة عين شمس

أ.د/ مجدى محمود محمد
استاذ الكمياء الحيوية
كلية العلوم- جامعة عين شمس

أ.د مجدى ولسن بولس
استاذ علم الحيوانات الضارةبالزراعه
معهد بحوث وقاية النباتات
مركز البحوث الزراعية

أ.د/ منى أحمد حسين
استاذ دكتورعلم النيماتولوجي والحشرات
قسم افات وقاية النبات
المركز القومى للبحوث

أ.د/ سعد محمد موسى
استاذ علم البيوتكنولجى – حشرات
معهد بحوث وقاية النباتات

Ain Shams University
Faculty of Science
Zoology

Name: Nermeen Mahmoud Mohamed Kandeel

Degree: Ph.D in Zoology 2020

Graduation:

B.Sc. Zoology 1994

M.Sc. in Zoology 2004

Faculty: Faculty of Science.

University: Ain Shams University.

قسم علم الحيوان
كلية العلوم
جامعة عين شمس

شكر

أشكر السادة الأساتذة الذين قاموا بالإشراف على الرسالة وهم :

أ.د / عبد الله محمد ابراهيم استاذ علم اللافقاريات كلية العلوم – جامعة عين شمس

أ.د / مجدي محمود محمد استاذ الكيمياء الحيوية كلية العلوم – جامعة عين شمس

أ.د/ مجدي ولسن بولس استاذ علم الحيوانات الضار بالزراعه – معهد بحوث وقاية النباتات مركز البحوث الزراعية

أ.د/ منى أحمد حسين أستاذ دكتور علم النيماتولوجي والحشرات قسم افات وقاية النبات – المركز القومي للبحوث.

أ.د / سعد محمد موسى أستاذ علم البيوتكنولجي – حشرات معهد بحوث وقاية النباتات.

كذلك الهيئات الآتية :

١- قسم علم الحيوان كلية العلوم – جامعة عين شمس.

٢- معمل البيوتكنولجي والبيولوجيا الجزئيئية - معهد وقاية النباتات – مركز البحوث الزراعية.

Abstract

Terrestrial gastropods are economic pests of horticultural crops, vegetables and nurseries in Egypt. Biological control using slug parasitic nematodes is one of the alternatives of chemical control to avoid the hazards of pesticides. This thesis describes the finding of new species of nematode parasites in *Limax flavus* slug in Egypt. It was identified as *Rhabdetella axei* using molecular (18s r DNA sequencing) technique, however its nucleotide sequencing exhibited 97.7% homology with this species of nematode. and this sequence was deposited in the Gene Bank under accession number (KU881631). Pathogenicity of this nematode was tested against three species of land gastropods, two land snails, *Monacha cartusiana*, *Eobania vermiculata* and one land slug, *Limax flavus. The* Results revealed that the nematode gave highly significant effect against *Monacha cartusiana* snail,whereas the high concentration of nematodes (12000 IJ/3ml) caused mortality rate that reached 80% after 7 days of treatment, but there was no effect on the other two land gastropods, *Eobania vermiculata* and *Limax flavus*. Also, the results revealed that *Rhabdetella axei* can live a dual life (free living and parasitic life) i.e. they could be pathogenic to only adult species of small size gastropods like *Monacha cartusiana* (parasitic life) and they can live necromenically on large size species of land gastropods. Finally it can be concluded that the nematode *Rhabdetella axei* can be used in integrated pest management as a biological control against *Monacha cartusiana* land snail . *Rhabdetella axei nematode* was then used for subsequent experiments to isolate the symbiotic and associated bacteria. Three associated bacteria were isolated from its gut and identified by biochemical and genetic analyses. The Biochemical characterization of the isolated bacteria showed that, these were *Serratia* ***liqufaciens*** , *Achromobacter denitrificans* and *Providencia rettgeri*. However, the molecular identification using 16SrRNAgene sequencing technique of these bacteria proved that, the three species are in consistence homology with genus classification but different at species level (*serratia proteamaculans 568;* 100 % and *Providencia vermicola;* 99.8% and *Alcaligenes faecalis;* 100 %). All these three sequences were deposited in the Gene Bank under accession numbers KU881632, KU881633and KU881634. This is the first report to isolate those bacterial species from such slug- parasitic nematode. The efficiency of the three bacterial species to kill the land gastropod *Eobania vermiculata* was investigated. The results revealed that 50h culture of all bacteria showed high molluscicidal activity against *Eobania vermiculata* snail whereas the highest concentration of *Serratia proteamaculans 568(21×107 CFU)*, P*rovidencia vermicola (22.5×107 CFU)and Alcaligenes faecalis (25.5×107 CFU) caused* mortality rate reaching 80%,86%and 93% respectively after five days of treatment, But 24h culture has no effect on that snail. All bacteria are gram negative related to family Enterobacteriae. So the results showed that 50h culture of bacteria secrete toxic metabolites like endotoxins , extracellular proteases and antibiotic compounds during this period and these toxic metabolites have role to cause mortality to snails. So the bacterial species identified in this study are good candidates for biological control of the destructive mollusc pests as *Eobania vermiculata* in Egypt.

Key words: Biological control, nematodes, Land gastropod species, Molecular identification, bacteria, pathogenicity.

MOLECULAR AND BIOCHEMICAL STUDIES ON SLUG- PARASITIC NEMATODES AND ThEIR POTENTIAL AS BIOCONTROL AGENT

A Thesis

Submitted to the Faculty of Science, Ain Shams University

For Ph.D. in Zoology

By

Nermeen Mahmoud Mohamed Kandeel

B.Sc. in Zoology, Cairo Univ. (1994)

M. Sc. In Zoology, Cairo Univ. (2004)

Supervisors

Dr. Abdallah Mohamed Ibrahim
Professor of Invertebrates.
Department of Zoology
Science, Ain Shams Universty.

Dr. Magdy Mahmoud Mohamed
Professor of Biochemistry
Department of Biochemistry
Science, Ain Shams University

Dr. Magdy Wilson Boles
Professor of Harmful Animals
Plant Protection Research Institute.
Agriculture Research center.

Dr. Mona Ahmed Hussein
Professor of Nematology and Entomology
National Rsearch Center

Dr. Saad Mohamed Moussa
Professor Of Biotechnology of Insects
Plant Protection Research institute
Head of foreign agricultural relations
at the ministry of agriculture

دراسات جزيئية وبيوكيميائية على نيماتودا البزاقات وكفاءتها كعنصر مكافحة حيوية

رسالة مقدمة
للحصول على درجة دكتوراه الفلسفه فى العلوم
فى علم الحيوان
من
نرمين محمود محمد قنديل
بكالوريوس علوم قسم علم الحيوان- جامعة القاهرة ١٩٩٤
ماجستير فى علم الحيوان – جامعة القاهرة ٢٠٠٤
تحت اشراف

أ.د/ عبدالله محمد ابراهيم
استاذ علم اللافقاريات
كلية العلوم- جامعة عين شمس

أ.د/ مجدى محمود محمد
استاذ الكمياء الحيوية
كلية العلوم- جامعة عين شمس

أ.د مجدى ولسن بولس
استاذ علم الحيوانات الضارةبالزراعه
معهد بحوث وقاية النباتات
مركز البحوث الزراعية

أ.د/ منى أحمد حسين
استاذ دكتورعلم النيماتولوجي
والحشرات
قسم افات وقاية النبات
المركز القومى للبحوث

أ.د/ سعد محمد موسى
أستاذ علم البيوتكنولجى – حشرات
مدير العلاقات الخارجية الزراعية
بوزارة الزراعة

CONTENT

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES