

sericologia

Revue des Vers à Soie

Journal of Silkworms

Publiée par la Commission Séricicole Internationale
Published by the International Sericultural Commission
25, quai Jean-Jacques Rousseau - 69350 La Mulatière - France

Directeur Gérant
Rédacteur en Chef
Rédacteur Adjoint

H. BOUVIER
G. CHAVANCY
A. FOURNIER

Managing Director
Chief Editor
Deputy Editor

COMITE DE REDACTION **EDITORIAL BOARD**

AKAPANTHU S. (Thaïlande / *Thailand*)
BEAULATON J. (France)
BECK D. (France)
BOSQUET G. (France)
CROIZIER G. (France)
COUBLE P. (France)
DANDIN S.B. (Inde / *India*)
DAS B.C. (Inde / *India*)
DATTA R.K. (Inde / *India*)
DOIRA H. (Japon / *Japan*)
FONSECA T.C. (Brésil / *Brazil*)
FOURCHE J. (France)
FREDDI G. (Italie / *Italy*)
GOLDSMITH M.R. (USA)
HORIE Y. (Japon / *Japan*)
IATROU K. (Canada)
JOLLY M.S. (Inde / *India*)
KOBAYASHI M. (Japon / *Japan*)
LEA H. Z. (Corée / *Korea*)

LEGAY J.-M. (France)
LIU S.-X. (Chine / *China*)
LU H.-S. (Chine / *China*)
MANO Y. (Japon / *Japan*)
MAUCHAMP B. (France)
PERSOONS C.J. (Pays-Bas / *The Netherlands*)
PRUDHOMME J.-C. (France)
REALI G. (Italie / *Italy*)
SHIMURA K. (Japon / *Japan*)
SHIRATA A. (Japon / *Japan*)
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)
SONWALKAR T.N. (Inde / *India*)
TAKAHASHI R. (Brésil / *Brazil*)
TAZIMA Y. (Japon / *Japan*)
TRENCZEK T. (Rép. tchèque / *Czech Republic*)
VAGO C. (France)
VEY A. (France)
XIA J.-G. (Chine / *China*)
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)
YANAGAWA H. (Japon / *Japan*)

SOMMAIRE - CONTENTS

Statistiques 1998 / 1998 Statistics i

Article scientifique / Scientific paper

- Study on the inheritance of food ingestion and digestion in hybrids between unibivoltine and multivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. races** 171
 Etude sur l'hérédité de l'ingestion et de la digestion de nourriture chez les hybrides entre monovoltins et polyvoltins du ver à soie, *Bombyx mori* L. 179
 P. TZENOV, N. PETKOV & Y. NATCHEVA

Rapports techniques / Technical reports

- Integrated approach for the management of the Uzi fly, *Exorista bombycis* (Louis), a pest of silkworm, *Bombyx mori* L.** 183
 Lutte intégrée contre la mouche Uzi, *Exorista bombycis* Louis, un parasite du ver à soie, *Bombyx mori* L. 189
 G. VEERANNA

- Studies on the feeding potential of a coccinellid predator, *Nephus* sp. on pink mealy bug, *Maconellicoccus hirsutus* (Green)** 193
 Etudes sur le potentiel alimentaire d'un coccinellidé prédateur, *Nephus* sp., sur la cochenille rose, *Maconellicoccus hirsutus* (Green) 201
 N. CHAKRABORTY, M. V. SANTHA KUMAR & S. K. SEN

- Breeding of bivoltine silkworm races with better survival and high shell content for tropics - Karnataka** 205
 Obtention de lignées de vers à soie bivoltins avec un taux de survie et une richesse soyeuse améliorés pour les zones tropicales au Karnataka 211
 B. M. SEKHARAPPA, P. G. RADHAKRISHNA, K. S. KESHAVAREDDY & S. B. DANDIN

- Impact of an artificial diet on larval development and cocoon characters of mulberry silkworm *Bombyx mori* L. (bivoltine pure races)** 215
 Impact d'une alimentation artificielle sur le développement larvaire et les caractéristiques du cocon du ver à soie du mûrier *Bombyx mori* L. (races pures bivoltines) 221
 B. HARESH KUMAR & S. S. THAKUR

- Effect of temperature on leaf - silk conversion in silkworm *Bombyx mori* L.** 225
 Effet de la température sur la conversion feuilles - soie chez *Bombyx mori* L. 233
 E. MUNIRAJU, B. M. SEKHARAPPA & R. RAGHURAMAN

- Effect of some plant growth regulators on photosynthetic efficiency and chlorophyll content in mulberry, *Morus alba*** 237
 Effet de certains régulateurs de croissance végétaux sur l'efficacité de la photosynthèse et la teneur en chlorophylle du mûrier, *Morus alba* 245
 M. SETUA, C. DAS, B. K. MANDAL & D. C. GHOSH

- Histochemistry of mulberry leaf infected by rust** 249
 Histochimie de la feuille de mûrier infestée par la rouille 257
 K. V. PRASAD, B. R. DAYAKAR YADAV & S. B. SULLIA

Enhanced efficacy of fungicides using sticker in foliar mulberry disease control . . .	263
Augmentation de l'efficacité des fongicides grâce à l'utilisation d'un mouillant dans la lutte contre la maladie foliaire du mûrier 267	
P. M. PRATHEESH KUMAR, S. M. H. QADRI, S. K. GANGWAR & B. SARATCHANDRA	

Antagonistic effect of <i>Bacillus subtilis</i> on mulberry root - rot fungus <i>Fusarium solani</i>	269
Effet antagoniste de <i>Bacillus subtilis</i> sur le champignon du pourrissement de la racine chez le mûrier, <i>Fusarium solani</i> 273	
T. PHILIP & D. D. SHARMA	

Influence of intercropping on severity of rust disease in mulberry	277
Influence des cultures intercalées sur la sévérité de la maladie de la rouille chez le mûrier 285	
K. V. PRASAD, B. R. DAYAKAR YADAV & S. B. SULLIA	

Effect of different combinations of NPK fertilizers on the yield and nutritive value of <i>Terminalia arjuna</i>	291
Effet de différentes combinaisons d'azote, de phosphore et de potassium (NPK) sur le rendement et la valeur nutritive de <i>Terminalia arjuna</i> 299	
U. S. P. SINHA, Md. ISA, D.P. SRIVASTAVA, A. K. SINHA & B. N. BRAHMACHARI	

Lipid content of Muga worm, <i>Antheraea assama</i> Westwood: impact of photoperiod and insecticides	303
Teneur en lipides du ver à soie Muga, <i>Antheraea assama</i> Westwood : impact de la photopériode et des insecticides 313	
D. S. BORA & R. HANDIQUE	

Notes brèves / Brief notes

New record of a homopteran pest on mulberry (<i>Morus alba</i>)	319
Un nouveau parasite homoptère du mûrier (<i>Morus alba</i>) 323	
U. K. BANDYOPADHYAY, S. K. RAINA, N. CHAKRABORTY, M. V. SANTHAKUMAR, S. K. SEN & B. SARATCHANDRA	

Susceptibility of the leaf - roller pest of mulberry, <i>Diaphania (Margaronia) pulverulentalis</i> to <i>Nosema bombycis</i> due to secondary contamination	325
Sensibilité du parasite de la tordeuse du mûrier, <i>Diaphania (Margaronia)</i> <i>pulverulentalis</i> à <i>Nosema bombycis</i> due à une contamination secondaire 329	
M. GEETHA BAI & T. RAMEGOWDA	

New host plants of Muga silkworm <i>Antheraea assama</i> Westwood	333
Nouvelles plantes hôtes pour le ver à soie Muga, <i>Antheraea assama</i> Westwood 335	
B. B. SINGHA & P. K. DAS	

Instructions aux auteurs / Information for contributors

Statistiques 1998 - 1998 Statistics

Tableau I. Production de cocons et de soie grège en 1998.

Table I. 1998 cocoon and raw silk production.

Pays	Cocons frais	Soie grège
Country	Fresh cocoons (tonnes)	Raw silk (tonnes)
Brésil / Brazil	14 594	1 820
Bulgarie / Bulgaria	50	8
Chine / China	588 000 ⁽¹⁾	57 500
Colombie / Colombia	37.3	6.4
Corée du Sud / South Korea	10	60
Côte d'Ivoire / Ivory Coast	8.7	-
Egypte / Egypt	7.8	1.8
Inde / India ⁽²⁾	127 495	15 246 ⁽³⁾
Italie / Italy	32.9	0
Japon / Japan	1 980	1 108
Madagascar	106 ⁽⁴⁾	-
Ouzbekistan / Uzbekistan	20 375	556
Philippines	1.8	0
Roumanie / Romania	3	0
Syrie / Syria	42	-
Thaïlande / Thailand	2307	889
Turquie / Turkey	135.5	21

- Non disponible / Not available.

(1) dont 155 200 tonnes non mûrier / including 155 200 tonnes non mulberry.

(2) 97/98.

(3) dont 1 198 tonnes non mûrier / including 1 198 tonnes non mulberry.

(4) dont 40 tonnes non mûrier / including 40 tonnes non mulberry.

Tableau II. Exportations et importations de cocons et de soie grège en 1998.

Table II. 1998 cocoon and raw silk imports and exports.

<i>Country</i>	Exportation de cocons secs	Exportation de soie grège	Importation de cocons secs	Importation de soie grège
Pays	<i>Dry cocoon exports (tonnes)</i>	<i>Raw silk exports (tonnes)</i>	<i>Dry cocoon imports (tonnes)</i>	<i>Raw silk imports (tonnes)</i>
Argentine / <i>Argentina</i>	0	0	0	3
Brésil / <i>Brazil</i>	548	1 665	0	1.08
Bulgarie / <i>Bulgaria</i>	-	-	-	-
Chine / <i>China</i>	615.19	9015.2 ⁽¹⁾	-	-
Colombie / <i>Colombia</i>	-	5.8	-	-
Corée du Sud / <i>South Korea</i>	0.08	2.8	158.3	1 228.5
Côte d'Ivoire / <i>Ivory Coast</i>	5.9	0	0	0
Egypte / <i>Egypt</i>	0	0	1.8	14.8
France	-	0.5	-	346
Inde / <i>India</i> ⁽²⁾	0	56 ⁽³⁾	13	2 760 ⁽⁴⁾
Italie / <i>Italy</i>	0	55	0	2 477
Japon / <i>Japan</i>	1.05	0.06	1 004	1 798 ⁽⁵⁾
Madagascar	-	-	-	-
Ouzbekistan / <i>Uzbekistan</i>	5638	50	0	0
Philippines	0	0	0	0
Roumanie / <i>Rumania</i>	-	-	-	-
Syrie / <i>Syria</i>	-	4	-	5
Thaïlande / <i>Thailand</i>	6	4	19.4	51.2
Turquie / <i>Turkey</i>	0	0	-	-

- Non disponible / *Not available.*

(1) dont 534.2 tonnes de soie tussah / *including 534.2 tonnes of tussah silk.*

(2) 97/98.

(3) dont 4 tonnes non mûrier / *including 4 tonnes non mulberry.*

(4) dont 1044 tonnes non mûrier / *including 1044 tonnes non mulberry.*

(5) dont 51 tonnes non mûrier / *including 51 tonnes non mulberry.*

Tableau III. Prix moyens du kilogramme de cocons en dollars américains en 1998.

Table III. Average prices for 1 kg cocoons in US dollars in 1998.

Pays	Prix payé aux producteurs (cocons frais)	Prix à l'exportation (cocons secs)	Prix à l'importation (cocons secs)
Country	Price paid to producers (fresh cocoons)	Export price (dry cocoons)	Import price (dry cocoons)
Brésil / Brazil	2.00	8.45	11.98
Bulgarie / Bulgaria	1.8	-	-
Chine / China	-	8.5	-
Colombie / Colombia	2.66	xx	xx
Côte d'Ivoire / Ivory Coast	1.5	6.8	xx
Egypte / Egypt	3.29	xx	3.080
Inde / India	2.97	xx	-
Japon / Japan	11.83	6.27	9.58
Madagascar	4	xx	xx
Ouzbékistan / Uzbekistan	2	4	xx
Philippines	2.1	xx	xx
Roumanie / Rumania	1	-	-
Thaïlande / Thailand	2	-	-
Turquie / Turkey	5.20	xx	-

- Non disponible / Not available.

xx : Pas d'exportation/d'importation de cocons./ No cocoon export/import.

STUDY ON THE INHERITANCE OF FOOD INGESTION AND DIGESTION IN HYBRIDS BETWEEN UNIBIVOLTINE AND MULTIVOLTINE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L. RACES

P. TZENOV, N. PETKOV & Y. NATCHEVA

Sericultural Experiment Station, 24, Mito Orozov Street, Vratza 3 000, Bulgaria.

A study aiming to analyse in detail the inheritance of the food ingestion and digestion in F1, F2 and BF1 hybrids between the Bulgarian uni-bivoltine pure lines Super 1 and Hessa 2 and the tropical multivoltine race Bonde 517 has been undertaken at the Sericultural Experiment Station of Vratza during the period of 1996-1998. The results obtained manifested that the quantities of food supplied, ingested, digested and leaf ingestibility were much higher in the unibivoltine lines compared with the multivoltine race. However, the food digestibility was significantly higher in the polyvoltine race. In all the four characters studied there was a positive heterosis in F1, obtained from the MP and negative heterosis obtained from the HP. An incomplete dominance for HP was detected in the F1 hybrids as regards the amount of food ingested, digested, ingestibility and digestibility. The epistasis between the dominant genes and between the additive and dominant genes as well were probably involved in the inheritance of food ingestion and digestion.

Keywords: *Silkworm, Bombyx mori* L., unibivoltine x multivoltine hybrids, food ingestion and digestion, inheritance.

INTRODUCTION

It is a well known fact that the multivoltine races reared in the tropical countries are characterised by larvae smaller in size than those of Japanese, Chinese and European races, shorter larval period, lower silk yield, spindle-shaped cocoon with yellow or green colour (Murakami and Ohtsuki, 1989). The tropical races also ingest and digest lower amount of food compared with the temperate ones (Prakash *et al.*, 1987; Remadevi *et al.*, 1992) which is probably involved in their low productivity.

However, the tropical race is remarkably vigorous as compared with the other geographical races, therefore, the introduction of its sturdiness character into the temperate race offers promising breeding materials for improving the vigour of the Japanese, Chinese or European stocks.

According to Murakami and Ohtsuki (1989), Chatterjee (1993), Raju and Krishnamurthy (1993), Maribashetty and Sreerama Reddy (1995), Nagaraju *et al.* (1996) a successful research work in this direction has been conducted in Japan and India recently. The main problem in the breeding process is to separate the valuable traits from the undesirable characters of the tropical race in order to create a new genotype having not only a higher tolerance to adverse environment but good productivity as well. Considering the above, it is very important to investigate the inheritance of the main breeding characters in the hybrids between univoltine and multivoltine silkworm races.

In fact, genetical aspects of inheritance food ingestion, digestion and utilisation efficiency in such type of hybrids haven't been studied enough.

The present study was undertaken in order to analyse in detail the inheritance of food ingestion and digestion in hybrids between the Bulgarian unibivoltine pure lines Super 1 and Hessa 2 and the tropical multivoltine race Bonde 517.

MATERIALS AND METHODS

The experimental work has been carried out during the period of 1996-1998 at the Sericultural Experiment Station of Vratza. The Bulgarian unibivoltine silkworm pure lines Super 1 and Hessa 2 and the tropical multivoltine race Bonde 517 have been used in the study.

The Super 1 line was originated from the Japanese strain N 124 which had been introduced into Bulgaria since 1971. The line has white cocoons with oblong and slightly constricted in the middle cocoon shape.

The origin of Hessa 2 line is from the Japanese race Hosho which had been introduced in Bulgaria since 1971. The line is of the Chinese type and has white oval cocoons. Both stocks are used as parental pure lines to widely raising in the field Bulgarian commercial hybrid Super 1 × Hessa 2 and the reciprocal.

The Bonde 517 race has been introduced into Bulgaria since 1988 through North Korea, however, it is a typical multivoltine stock and its native origin is from Southeast Asia. This race has spindle shaped light yellow-green cocoons with a cotton-like flossy structure, sometimes non-spun at one of the tops.

Besides the three races described, their F1, F2 and BF1 hybrids were used also in the experiments. In order to provide identical feeding conditions for all parental and hybrid generations, silkworm eggs of parent races, F1, F2 and BF1 crosses were prepared together annually and the larvae were reared at the same time.

Fifth instar silkworm larvae were used to collect the quantitative data for calculating the different feeding indices because of the fact that about 70 % of the total leaf quantity is consumed in the fifth instar by the silkworm larvae (Petkov and Penkov, 1980).

The ingestion and digestion of the dry matter were determined following the gravimetric method, described by several authors (Waldbauer, 1964 ; Horie *et al.*, 1976 ; Horic and Watanabe, 1983 ; Tzenov, 1993).

The experiments were carried out by feeding the larvae on Vratza 106 mulberry variety. Just after the fourth moult, 100 larvae from each race and hybrid, irrespective of the sex were counted, separated into 4 replicates, consisting of 25 individuals each, placed separately in trays and reared with equal feeding amounts. In each replicate the larvae were counted daily and the sick one if any were replaced by healthy larvae of the same age from a reserve stock reared in the same manner as the experimental group. The left over leaf and the excrements were collected carefully, dried to a constant weight and separated.

The larvae were reared at 23°C and 70-75 % RH and fed 3 times per day. The heterosis expression in F1 was calculated using the following formulae:

$$\frac{\bar{X}_{F1} - \bar{X}_{HP}}{\bar{X}_{HP}} \text{ and } \frac{\bar{X}_{F1} - \bar{X}_{MP}}{\bar{X}_{MP}} \text{ in percentage}$$

The depression in F2 was calculated by the formula:

$$\frac{\bar{X}_{F2} - \bar{X}_{F1}}{\bar{X}_{F2}} \text{ in percentage}$$

The dominance effects were determined using the potency ratio method described by Petr and Frey (1966) and Romero and Frey (1973). The degrees of dominance hp_1 and hp_2 displayed for each character in F1 and F2 were calculated using the formulae, reported previously (Tzenov *et al.*, 1994).

The dominant, additive and epistatic gene interactions in the inheritance of quantitative characters were determined according to the following formulae described by Gamble (1962):

Additive genes effect:

$$(a) = BF1P1 - BF1P2$$

Dominant genes effect:

$$(d) = 1/2P1 - 1/2P2 + F1 - 4F2 + 2BF1P1 + 2BF1P2$$

Effect of the epistasis additive $\times$ additive genes interaction:

$$(aa) = -4F2 + 2BF1P1 + BF1P2$$

Effect of the epistasis additive $\times$ dominant genes interaction:

$$(ad) = -1/2P1 + 1/2P2 + BF1P1 + BF1P2$$

Effect of the epistasis dominant $\times$ dominant genes interaction:

$$(dd) = P1 + P2 + 2F1 + 4F2 - 4BF1P1 - 4BF1P2$$

Where P1, P2 were the main values in the both parents, BF1P1 and BF1P2 were the backcrosses with the first and the second parent.

The F2 values were accepted as 'genetic background' and were marked as 'm'. The data obtained were analysed statistically (Lidanski, 1988).

RESULTS AND DISCUSSION

The mean values of the characters characterising the food ingestion and digestion are shown in table I. It is evident from the table that the quantity of the mulberry leaves supplied, ingested and digested, in the unibivoltine silkworm larvae was about 1.50, 3.83 and 3.24 times higher respectively compared with the multivoltine one.

The unibivoltine lines manifested also a much higher food ingestibility, but the food digestibility was significantly higher in the multivoltine race. The absolute values of the food ingested and digested in the unibivoltine lines obtained in our experiments were remarkably lower compared to those reported by Sarkar and Fujita (1994) in the Japanese hybrid N201 $\times$ C201, Horie and Watanabe (1983) in the Japanese hybrid N134 $\times$ C135 and similar to the results published by Horie *et al.* (1976) for the Japanese hybrid N124 $\times$ C124 and Sarkar (1993) for the Indian bivoltine breeds Kalimpong A and Kalimpong B.

According to Prakash *et al.* (1987), Remadevi *et al.* (1992) the quantities of the food ingested and digested during the fifth larval instar in the multivoltine races were 1.482 - 3.082 g and 0.552 - 1.346 g respectively.

The data for Bonde 517 race obtained in our experiment manifested that this stock appeared to ingest and digest very low quantities of food compared with other polyvoltine races.

The results obtained showed that the backcrosses with the unibivoltine lines had higher quantity of food ingested and digested compared with F1 and the values of the both traits declined in the backcrosses with Bonde 517 race.

The amount of food ingested and digested by a single larva in the F1 hybrids was very similar to those reported by Raman *et al.* (1993) in the Indian traditional Cb hybrid, namely PM $\times$ NB4D2.

In table II, there are presented the data characterising the heterosis in F1, depression in F2 and the degrees of dominance displayed for the quantities of food ingested and digested, food ingestibility and digestibility. It is evident from the table that in all the four characters there is a positive heterosis expression in F1, obtained from the middle parent value (MP) and a negative heterosis obtained from the higher parent value (HP). Similar results were obtained by Sarkar (1993) in his experiment with the Indian bivoltine races KA and KB, multivoltine Nistari and their F1 hybrids.

Table I. Mean values of the characters, depicting efficiency of feeding**Tableau I. Valeurs moyennes des traits décrivant l'efficacité de l'alimentation**

Races and hybrids	Mulberry leaves supplied	Mulberry leaves ingested	Food digested	Food ingestibility	Food digestibility
<i>Races et hybrides</i>	<i>Feuilles de mûrier fournies</i>	<i>Feuilles de mûrier fournies</i>	<i>Nourriture digérée</i>	<i>Ingestion de nourriture</i>	<i>Digestion de nourriture</i>
Super 1	5.435	3.393	1.414	72.47	35.90
Hessa 2	5.407	4.071	1.383	75.29*	33.97
Bonde	3.604***	1.046***	0.431***	29.02***	41.20**
F1 Super 1 × Bonde	4.888**	2.858***	1.090***	58.47***	38.14*
F1 Bonde × Super 1	4.727**	2.833***	1.103***	59.93***	38.93*
F1 Hessa 2 × Bonde	4.841**	2.984***	1.237**	61.64***	41.45**
F1 Bonde × Hessa 2	4.841**	2.890***	1.129***	59.70***	39.07*
F2 Super 1 × Bonde	4.999***	2.732***	1.119***	54.65***	40.96**
F2 Bonde × Super 1	4.948**	2.922***	1.256**	59.05***	42.98***
F2 Hessa 2 × Bonde	4.814**	2.767***	1.102***	57.48***	39.83**
F2 Bonde × Hessa 2	4.968*	2.961***	1.073***	59.60***	36.24
(Super 1 × Bonde) × Super 1	4.992***	3.578	1.385	71.67	38.71*
(Super 1 × Bonde) × Bonde	4.727**	2.329***	1.063***	49.27***	45.64***
(Hessa 2 × Bonde) × Hessa 2	5.019*	3.353	1.205**	66.81*	35.94
(Hessa 2 × Bonde) × Bonde	4.872***	2.531***	1.095***	51.95***	43.26***
(Bonde × Super 1) × Bonde	4.519***	2.348***	1.104***	51.96***	47.02***
(Bonde × Super 1) × Super 1	5.345	3.449	1.229**	64.53**	35.63
(Bonde × Hessa 2) × Bonde	4.877***	2.373***	1.125***	48.66***	47.41***
(Bonde × Hessa 2) × Hessa 2	5.397	3.785	1.443	70.13	38.12*

* $P < 5\%$. ** $P < 1\%$. *** $P < 0.1\%$.

A depression of the traits studied values was detected in most of the hybrids in F2.

The values obtained for hp1 proved that the food ingestion and digestion were inherited in F1 by incomplete dominance of the parent having higher expression of the character (hp1 = 0.00 - 0.50).

In some hybrids hp2 values were lower than hp1 which according to Romero and Frey (1973) was due to confounding effects of epistasis.

The data manifested the gene effects in the characters studied expression are shown in table III.

In all the traits the 'dd' and 'ad' gene interaction effects showed the highest and statistically significant values.

The results obtained proved that the epistatic gene interactions between the dominant genes and between the additive and dominant genes were responsible in the highest extent for the food ingestion and digestion inheritance.

Table II. Heterosis, depression and degrees of dominance

Tableau II. Hétérosis, dépression et degrés de dominance

Hybrids	Heterosis indices in F1 obtained from		Depression in F2	Degrees of dominance in F1 and F2	
	MP	HP		hp1	hp2
<i>Hybrides</i>	<i>Indices hétérosis en F1 obtenus à partir de :</i>		<i>Dépression en F2</i>	<i>Degrés de dominance en F1 et F2</i>	
	MP	HP		hp1	hp2
Quantity of food ingested / Quantité de nourriture ingérée					
Super 1 × Bonde	14.66	27.44	-4.61	0.25	0.17
Bonde × Super 1	13.66	28.08	3.05	0.24	0.30
Hessa 2 × Bonde	16.63	26.70	-7.84	0.28	0.14
Bonde × Hessa 2	12.96	29.01	2.40	0.22	0.27
Quantity of food digested / Quantité de nourriture digérée					
Super 1 × Bonde	18.16	22.91	2.59	0.34	0.40
Bonde × Super 1	19.57	21.99	12.18	0.37	0.68
Hessa 2 × Bonde	36.38	10.56	-12.25	0.69	0.41
Bonde × Hessa 2	24.48	18.37	-5.22	0.47	0.34
Food ingestibility / Ingestibilité de nourriture					
Super 1 × Bonde	15.22	19.32	-6.99	0.36	0.18
Bonde × Super 1	18.10	17.30	-1.49	0.42	0.38
Hessa 2 × Bonde	18.19	18.13	-7.24	0.41	0.23
Bonde × Hessa 2	14.47	20.71	0.17	0.33	0.32
Food digestibility / Digestibilité de nourriture					
Super 1 × Bonde	-1.06	7.43	6.08	-0.15	0.91
Bonde × Super 1	0.99	5.51	9.42	0.14	1.67
Hessa 2 × Bonde	10.28	0.61	-4.07	1.07	0.62
Bonde × Hessa 2	3.95	-5.17	-7.01	0.42	0.37

*P < 5 % ** P < 1 % P *** P < 0.1 %

Table III. Gene effects

Tableau III. Effets génétiques

Hybrids <i>Hybrides</i>	Gene effects <i>Effets génétiques</i>					
	m	a	d	aa	ad	dd
Quantity of food ingested / <i>Quantité de nourriture ingérée</i>						
Super 1 × Bonde	2732***	1249***	5191***	886***	4460***	16633***
Bonde × Super 1	2922***	-1101***	1292***	-94*	7244***	26747***
Hessa 2 × Bonde	2767***	822***	5197***	700***	4371***	18865***
Bonde × Hessa 2	2961***	-1412***	1849***	472**	7671***	28389***
Quantity of the food digested / <i>Quantité de nourriture digérée</i>						
Super 1 × Bonde	1119***	322**	2001***	420***	1972***	7213***
Bonde × Super 1	1256***	-125*	254*	-358***	2824***	9575***
Hessa 2 × Bonde	1102***	110*	1905***	192**	1824***	8256***
Bonde × Hessa 2	1073***	-318**	897**	844***	3044***	9636***
Food ingestibility / <i>Ingestibilité</i>						
Super 1 × Bonde	54.65***	22.40**	103.48***	23.28**	99.21***	347.43***
Bonde × Super 1	59.05***	-12.57**	34.98**	-3.22*	138.21***	507.83***
Hessa 2 × Bonde	57.48***	14.86**	92.38***	7.60*	95.62***	398.07***
Bonde × Hessa 2	59.60***	-21.47**	35.74**	-0.82	141.93***	547.99***
Food digestibility / <i>Digestibilité</i>						
Super 1 × Bonde	40.96***	-6.93*	40.35***	4.86*	87.08***	344.94***
Bonde × Super 1	42.98***	11.99**	46.20***	-5.42*	80.60***	278.92***
Hessa 2 × Bonde	39.83***	-7.32*	36.92***	-0.92	82.81***	346.67***
Bonde × Hessa 2	36.24***	9.29**	68.78***	26.10***	81.92***	261.11***

* P < 5 %. ** P < 1 % P. *** P < 0.1 %

In conclusion, the results of our investigation brought out that the quantities of food supplied, ingested, digested and leaf ingestibility were much higher in the unibivoltine lines compared with the multivoltine race. However, the food digestibility was significantly higher in the polyvoltine race.

In all the four characters studied there was a positive heterosis obtained from the MP and negative heterosis obtained from the HP.

An incomplete dominance for HP was detected in the F1 hybrids as regards the amount of food ingested, digested, ingestibility and digestibility.

The epistasis between the dominant genes and between the additive and dominant genes as well was probably involved in the highest extent in the food ingestion and digestion inheritance.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to the Bulgarian National Fund for Scientific Research who financed partly this study.

REFERENCES

- CHATTERJEE S.N. (1993) Silkworm breeding in India, *Sericologia*, 33(3), 427-447.
- GAMBLE E. (1962) *Can. J. Plant Sci.*, 42, 339-348.
- HORIE Y., INOKUCHI T., WATANABE K., NAKASONE S., YANAGAWA H. (1976) Quantitative study on food utilisation by the silkworm, *Bombyx mori* L. through its life cycle. I. Economy of dry matter, energy and carbon. *Bull. Sericult. Exp. Sta. (Tokyo)*, 26(6), 411-442.
- HORIE Y., WATANABE K. (1983) Daily utilisation and consumption of dry matter in food by the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.*, 18(1), 70-80.
- LIDANSKI T. (1988) Statistical methods in the biology and agriculture. Zemizdat, Sofia, 376 pp.
- MARIBASHETTY V.G., SREERAMA REDDY G. (1995) Breeding of a robust bivoltine line MU 720 of the silkworm, *Bombyx mori* L., for the tropics. *Sericologia*, 35(2), 203-212.
- MURAKAMI A., OHTSUKI Y. (1989) Genetic studies on tropical races of the silkworm, *Bombyx mori* with special reference to cross breeding strategy between tropical and temperate races. I. Genetic nature of the tropical multivoltine strain Cambodge. *Jarq*, 23(1), 37-45.
- NAGARAJU J., RAJE URS, DATTA R.K. (1996) Crossbreeding and heterosis in the silkworm, *Bombyx mori*, review. *Sericologia*, 36(1), 1-20.
- PETKOV M., PENKOV I. (1980) Sericulture reference book, Zemizdat, Sofia, 200 pp.
- PETR F.C., FREY K.J. (1966) Genotypic correlations, dominance and heritability of quantitative characters in oats. *Crop Sci.*, 6, 259-262.
- PRAKASH R., NAIK M., DELVI M. (1987) Food utilisation in different races of silkworm, *Bombyx mori* L.. *Sericologia*, 27(3), 391-397.
- RAJU P.J., KRISHNAMURTHY N.B. (1993) Breeding of two bivoltine, MG511 and MG512, of silkworm, *Bombyx mori* L., for higher viability and silk productivity. *Sericologia*, 33(4), 577-587.
- REMADEVI O.K., MAGADUM S., SHIVASHANKAR N., BENCHAMIN K.V. (1992) Evaluation of food utilisation efficiency in some polyvoltine breeds of silkworm, *Bombyx mori* L.. *Sericologia*, 32(1), 61-66.
- RAMAN K.V., BENCHAMIN K.V., MAGADUM S.B., REMADEVI O.K. (1993) Studies on the nutritional efficiency in silkworm, *Bombyx mori* L.. *Indian J. Seric.*, 32(1), 43-49.
- ROMERO G.E., FREY K.J. (1973) Inheritance of semidwarfness in several wheat crosses. *Crop. Sci.*, 13, 334-337.
- SARCAR A. (1993) Effects of different races of silkworm (*Bombyx mori* L.) by feeding mulberry (*Morus indica* L.) leaves varying in ploidy level. *Sericologia*, 33(1), 25-34.
- SARCAR A., FUJITA H. (1994) Better technique for nutritive evaluation of mulberry leaves for silkworm, *Bombyx mori* L.. *Indian J. Seric.*, 33(1), 19-22.
- TZENOV P. (1993) Study on the food utilisation in genetic sex-limited breeds for egg and larval traits of the silkworm, *Bombyx mori* L.. at moderate, reduced and excess feeding amounts. *Sericologia*, 33(2), 247-256.
- TZENOV P., PETKOV N., NACHEVA Y. (1994) Studies on heterosis expression and degrees of dominance displayed for some quantitative traits characterising the food utilisation in F1 crosses between Japanese and Chinese bivoltine races of the silkworm, *Bombyx mori* L.. *Sericologia*, 34(2), 421-429.
- WALDBAUER G.P. (1964) The consumption, digestion and utilisation of solanaceous and non-solanaceous plants by tobacco hornworm, *Protoparce sexta* (Johan), (Lep. : Sphin.). *Ent. Ext. Appl.*, 7, 253-269.

ETUDE SUR L'HEREDITE DE L'INGESTION ET DE LA DIGESTION DE NOURRITURE CHEZ LES HYBRIDES ENTRE MONOVOLTINS ET POLYVOLTINS DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

P. TZENOV, N. PETKOV & Y. NATCHEVA

Sericultural Experiment Station, 24, Mito Orozov Street, Vraiza 3 000, Bulgarie.

Une étude visant à analyser en détail l'hérédité concernant l'ingestion et la digestion de nourriture chez les hybrides F1, F2 et BF1 provenant des races pures mono-bivoltines Bulgares, Super 1 et Hessa 2 et de la race tropicale polyvoltine, Bonde 517, a été menée à la Station Expérimentale de Sériculture de Vratza de 1996 à 1998. Les résultats obtenus ont montré que les quantités de nourriture fournies, ingérées, digérées et le potentiel d'ingestion de feuilles étaient plus importants chez les lignées monobivoltines que chez la race polyvoltine. Cependant, la digestibilité de la nourriture est significativement plus importante chez la race polyvoltine. Pour les quatre caractéristiques étudiées, il y a une hétérosis positive en F1, par rapport au parent moyen (PM) et une hétérosis négative par rapport au meilleur parent (HP). Une dominance incomplète pour HP a été détectée chez les hybrides F1 en ce qui concerne le total de nourriture ingérée, digérée, l'ingestibilité et la digestibilité. L'épistasie entre les gènes dominants ainsi qu'entre les gènes additifs et dominants est probablement concernée dans l'hérédité de l'ingestion et la digestion de nourriture.

INTRODUCTION

Il est connu que les races polyvoltines élevées dans les pays tropicaux sont caractérisées par des larves de tailles plus petites contrairement aux races Japonaise, Chinoise et Européenne mais aussi par une période larvaire plus courte, un rendement en soie plus faible, des cocons de couleur vert jaune à la forme allongée (Murakami et Ohtsuki, 1989). Les races tropicales ingèrent et digèrent moins de nourriture comparativement à celles des climats tempérés (Prakash et coll., 1987 ; Remadevi et coll., 1992) ; cela a probablement un lien avec leur rendement plus faible.

Cependant, la race tropicale est remarquablement vigoureuse en comparaison avec les autres races, donc, l'introduction de sa robustesse chez la race 'tempérée' offre des matériaux d'élevages prometteurs pour améliorer la vigueur des races Japonaise, Chinoise ou Européenne.

Selon Murakami et Ohtsuki (1989), Chatterjee (1993), Raju et Krishnamurthy (1993), Maribashetty et Sreerama Reddy (1995), Nagaraju et coll. (1996), un travail de recherche fructueux dans cette voie a été récemment mené au Japon et en Inde. Le problème majeur dans la procédure d'élevage est de séparer les caractéristiques valables de celles indésirables de la race tropicale afin de créer un nouveau génotype possédant non seulement une tolérance plus importante à un environnement hostile mais aussi une bonne productivité. En considérant les éléments ci-dessus, il est très important de faire des recherches sur l'hérédité des principales caractéristiques d'élevage des hybrides entre les races de vers à soie monovoltines et polyvoltines.

En fait, les aspects génétiques concernant l'hérédité de l'ingestion, de la digestion de la nourriture et l'efficacité de l'utilisation chez de tels types d'hybrides n'ont pas été suffisamment étudiés.

Cette étude a été entreprise afin d'analyser en détail l'hérédité de l'ingestion et de la digestion de nourriture chez les hybrides entre les lignées pures monobivoltines Bulgare, Super 1 et Hessa 2 et la race tropicale polyvoltine Bonde 517.

MATERIELS ET METHODES

Le travail expérimental a été entrepris entre 1996 et 1998 à la Station Expérimentale de Sériculture de Vratza. Les lignées pures de vers à soie Bulgare monobivoltines, Super 1 et Hessa 2 ainsi que la race tropicale polyvoltine Bonde 517 ont été utilisées pour cette étude.

La lignée Super 1 est originaire d'une souche Japonaise N124 qui a été introduite en Bulgarie en 1971. La lignée a des cocons blancs allongés, légèrement cintrés.

L'origine de la lignée Hessa 2 vient de la race Japonaise Hosho qui a été introduite en Bulgarie en 1971. La lignée est du type Chinois, ses cocons sont blancs et de forme ovale. Les deux races sont utilisées en tant que lignées parentales pures afin de diffuser largement l'hybride commercial Bulgare, Super 1 × Hessa 2 et réciproquement.

La race Bonde 517 a été introduite en Bulgarie en 1988 par la Corée du Nord, cependant, c'est une race polyvoltine typique et son origine est d'Asie du Sud Est. Cette race file des petits cocons vert jaune, avec une constitution semblable à de la bourre de coton et parfois le cocon est non filé à une extrémité.

En plus des trois races décrites, les hybrides F1, F2 et BF1 ont été utilisés pour les expérimentations. Afin d'apporter des conditions identiques d'alimentation pour toutes les générations parentales et hybrides, les oeufs de vers à soie des races parentes, F1, F2 et BF1 ont été préparés ensemble sur une année, les larves ont été élevées en même temps.

Les larves de vers à soie au cinquième stade larvaire ont été utilisées pour collecter les données quantitatives afin de calculer les différents indices d'alimentation car environ 70 % de la quantité totale de feuilles est consommée lors du cinquième stade larvaire par les larves de vers à soie (Petkov et Penkov, 1980).

L'ingestion et la digestion de matières sèches sont déterminées suivant la méthode gravimétrique décrite par plusieurs auteurs (Waldbauer, 1964 ; Horie et coll., 1976 ; Horie et Watanabe, 1983 ; Tzenov, 1993).

Les expériences ont été entreprises en nourrissant les larves avec la variété de mûrier Vratza 106. Peu après le quatrième mue, 100 larves de chaque race et hybride, sans tenir compte du sexe, ont été comptées puis séparées en quatre répétitions constituée de 25 individus chacune, elles ont été placées séparément en plateaux et élevées avec un même quantité d'aliments. Pour chacune des répétitions, les larves ont été comptées tous les jours et les larves malades ont été remplacées par des larves saines du même âge provenant d'un stock de réserve élevé de la même manière que le groupe expérimental. Le reste de feuilles et les excréments ont été ramassées avec soin, séchés jusqu'à un poids constant puis séparés.

Les larves ont été élevées à 23 °C, 70-75 % RH et nourries trois fois par jours. L'expression de l'hétérosis en F1 a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\frac{\bar{X}F1 - \bar{X}HP}{\bar{X}HP} \text{ et } \frac{\bar{X}F1 - \bar{X}MP}{\bar{X}MP} \text{ en pourcentage}$$

La dépression en F2 a été calculée avec la formule :

$$\frac{\bar{X}F2 - \bar{X}F1}{\bar{X}F2} \text{ en pourcentage}$$

Les effets de la dominance ont été déterminés en utilisant la méthode de ratio de puissance décrite par Petr et Frey (1966) ainsi que Romero et Frey (1973). Les degrés de dominance h_{p1} et h_{p2} exposés pour chaque caractéristique F_1 et F_2 ont été calculés en utilisant les formules notés ci-dessus (Tzenov et coll., 1994).

Les interactions des gènes dominants, additifs et épistatiques dans l'hérédité des caractéristiques quantitatives ont été déterminées selon les formules suivante décrite par Gamble (1962).

Effet des gènes additifs :

$$(a) = BF1P1 - BF1P2$$

Effets des gènes dominants :

$$(d) = 1/2P1 - 1/2P2 + F1 - 4F2 + 2BF1P1 + 2BF1P2$$

Effet de l'interaction de l'épistasie des gènes additifs $\times$ additif :

$$(aa) = -4F2 + 2BF1P1 + BF1P2$$

Effet de l'interaction de l'épistasie, gène additif $\times$ gène dominant :

$$(ad) = -1/2P1 + 1/2P2 + BF1P1 + BF1P2$$

Effet de l'épistasie dominante $\times$ interaction des gènes dominants :

$$(dd) = P1 + P2 + 2F1 + 4F2 - 4BF1P1 - 4BF1P2$$

Avec P_1 , P_2 pour valeurs principales chez les deux parents, $BF1P1$ et $BF1P2$ étant les rétrocroisements avec le premier et le second parent.

Les valeurs F_2 ont été acceptées en tant que "bruit de fond" génétique et ont été indiquées par 'm'. Les données obtenues ont été analysées statistiquement (Lidanski, 1988).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les valeurs moyennes des traits caractérisant l'ingestion et la digestion de nourriture sont indiquées dans le tableau I. A partir du tableau, nous remarquons que les quantités de feuilles de mûriers fournies, ingérées, et digérées chez les larves de vers à soie monobivoltins sont d'environ 1,50 ; 3,83 et 3,24 fois plus importantes respectivement, en les comparant aux polyvoltins.

Les lignées monobivoltines ont manifesté aussi une ingestibilité de nourriture beaucoup plus importante, mais la digestibilité de nourriture est significativement plus importante chez les races polyvoltines. Les valeurs absolues de la nourriture ingérée et digérée chez les lignées monobivoltines obtenues dans nos expériences ont été remarquablement plus faibles en comparaison avec celles rapportées par Sarkar et Fujita (1994) chez l'hybride Japonais $N201 \times C201$, Horie et Watanabe (1983) avec l'hybride Japonais $N134 \times C135$ et similaires aux résultats publiés par Horie et coll. (1976) pour l'hybride Japonais $N124 \times C124$ et Sarkar (1993) pour les reproductions de bivoltins indiens Kalimpong A et Kalimpong B.

Selon Prakash et coll. (1987), Remadevi et coll. (1992) les quantités de la nourritures ingérées et digérées lors du cinquième stade larvaire chez les races polyvoltines ont été de 1,482 - 3,082 g et 0,552 - 1,346 g respectivement.

Les données obtenues pour la race Bonde 517 lors de notre expérience montrent que ce stock semble ingérer et digérer de très petites quantités de nourriture en comparaison avec les autres races polyvoltines.

Les résultats obtenus ont montré que les rétrocroisements avec des lignées monobivoltines ont une quantité plus importante de nourriture ingérée et digérée en comparaison avec F_1 et les valeurs des caractéristiques ont décliné pour les rétrocroisements avec la race Bonde 517.

La quantité de nourriture ingérée et digérée par une seule larve hybride F1 est très similaire à celle notée par Raman et coll. (1993) chez l'hybride commun Indien, Cb, nommément PM × NB4D2.

Sur le tableau II sont présentées les données caractérisant l'hétérosis en F1, la dépression en F2 et les degrés de dominance pour les quantités de nourriture ingérée et digérée, l'ingestibilité et digestibilité de nourriture. A partir du tableau, nous remarquons que pour les quatre caractéristiques, il y a une expression d'hétérosis positive en F1, obtenue à partir d'une valeur des parents moyens (PM) et une hétérosis négative obtenue à partir d'une valeur des meilleurs parents (PH). Des résultats similaires ont été obtenus par Sarkar (1993) pour son expérience avec les races indiennes bivoltines KA et KB, le polyvoltin Nistari et leurs hybrides F1.

Une diminution dans les valeurs des caractéristiques étudiées a été détectée dans la plupart des hybrides F2.

Les valeurs obtenues pour $hp1$ prouvent que l'ingestion et la digestion de nourriture ont été héritées en F1 par une dominance incomplète du parent ayant une expression supérieure du caractère ($hp1 = 0.00 - 0.50$).

Chez certains hybrides où les valeurs $hp2$ ont été plus basses que $hp1$ en accord avec Romero et Frey (1973), cela est dû aux effets confondants de l'épistasie.

Les données ont mis en avant les effets génétiques dans l'expression des traits étudiés, elles sont présentées dans le tableau III.

Pour toutes les caractéristiques, les effets d'interactions génétiques 'dd' et 'ad' ont montré les valeurs les plus importantes et significatives.

Les résultats obtenus prouvent que les interactions des gènes épistatiques entre les gènes dominants et entre les gènes additifs et les gènes dominants sont responsables de la plus grande part de l'hérédité en ce qui concerne l'ingestion et la digestion de nourriture.

En conclusion, les résultats de nos recherches ont montré que les quantités de nourriture fournies, ingérées, digérées et l'ingestibilité de la feuille sont plus importantes chez les lignées monobivoltines en comparaison avec la race polyvoltine. Cependant, la digestibilité de la nourriture est manifestement plus importante chez la race polyvoltine.

Pour les quatre caractéristiques étudiées, il y a eut une hétérosis positive obtenue à partir de PM et une hétérosis négative obtenue de HP.

Une dominance incomplète pour HP a été décelée chez les hybrides F1 par rapport à la quantité de nourriture ingérée, digérée, l'ingestibilité et la digestibilité.

L'épistasie entre les gènes dominants et les gènes additifs et dominants est probablement impliquée dans la plus grande part d'hérédité d'ingestion et de digestion de nourriture.

INTEGRATED APPROACH FOR THE MANAGEMENT OF THE UZI FLY, *EXORISTA BOMBYCIS* (LOUIS), A PEST OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

G. VEERANNA

Entomology Unit, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute,
Thalaghattapura, Bangalore 560 062, India.

*Integration of uzicide, an ovicide and Nesolynx thymus (Girault) (Eulophidae), an ectopupal gregarious parasitoid of the uzi fly were used to minimise the infestation of the uzi fly, Exorista bombycis (Louis) (Tachinidae), a serious endoparasitoid of silkworm, Bombyx mori L. Infestation of the uzi fly in the treated and control rearings of the silkworm crops in the identified villages was $1.26 \pm 0.21\%$ and $10.12 \pm 1.23\%$; respectively thereby showing 87.43 per cent reduction in the silkworm crop loss due to the uzi fly infestation ($P < 0.001$). Application of a single component (*N. thymus*) in the silkworm rearings of two villages showed a significant decline (27.45 %) of the uzi fly infestation to silkworms compared to the control rearings.*

INTRODUCTION

Exorista bombycis (Louis) (Diptera:Tachinidae), a serious endoparasitoid of the silkworm, *Bombyx mori* L. was introduced into Karnataka (South India) from West Bengal through silkworm seed cocoons during 1980 (Jolly, 1981). Since then, this parasitoid has established itself and causes sizable damage to silkworm cocoon crops in South India. During the initial stage of its introduction, it was reported that more than 80 per cent of the silkworm crops were affected by this parasitoid, leading to the harvest of only 5 to 10 kg of cocoons for 100 dfls, whereas this normally is an average of 40 kg for 100 dfls (Anonymous, 1982). Due to various recommendations such as nylon net/mesh enclosures for the prevention of egg laying on the silkworm body, uzicide to kill the eggs on the silkworm body and uzi powder to kill the eggs as well as the maggots inside the body of silkworms, at present, the rate of uzi fly infestation ranges from 12 - 15 per cent (Mukherjee, 1912; Jameson, 1922; Bharali, 1968; Kumar, 1987; Veeranna *et al.*, 1994).

In the recent past, several hymenopteran pupal / larval parasitoids of the uzi fly (Eulophids, Encyritids, Chalcids, Pteromalids and Diapriids) were reported (Pradip Kumar *et al.*, 1986; Veeranna *et al.*, 1987a-b; Veeranna and Jyothi, 1988, 1994; Veeranna and Nirmala, 1992). Among them, *Nesolynx thymus* (Girault), an eulophid and *Dirhinus anthraciae* Walker a Chalcid were found to have the best characteristics as potential control agents (Jyothi *et al.*, 1993, Pradip Kumar *et al.*, 1993a). In the present investigation, efforts were made to integrate an ovicide (uzicide) and *Nesolynx thymus* (an ectopupal gregarious parasitoid) simultaneously to determine the joint efficacy in bringing down the uzi fly infestation under field conditions.

MATERIALS AND METHODS

The gregarious ectopupal parasitoid (*N. thymus*) of the uzi fly and a liquid ovicide formulation (Uzicide) were used simultaneously in the silkworm rearings under the existing conditions of

Gadasalli village (Bangalore District) during 1991-92. Silkworm rearings of Agara village (Bangalore District) were used as control (without treatment). For comparison, the rate of uzi fly infestation was determined in the silkworm crops in both operation areas during the previous year of implementation of this programme.

Silkworm Rearings :

The silkworm cultures for commercial purpose were performed indoors by the local sericulturists according to the method of Krishnaswamy (1978). A total number of 7925 Disease free layings (Dfls) (1 Dfls = 400 eggs) was reared during different months in Gadasalli village and were subjected to the integrated control method. A total number of 4920 Dfls were reared in Agara village as a control. Data on the rate of uzi fly infestation were collected separately both from treated and control rearings by random sampling methods in different rearings from III to V instars as the uzi fly preferred to lay eggs on III to V instar larvae.

***Nesolynx thymus* :**

This parasitoid was cultured in large numbers in 1000 ml conical flasks on uzi fly puparia procured from the Government Cocoon markets of Karnataka, as maggots that had emerged from infested cocoons. These maggots were brought to the laboratory and maintained in enamel tray containing sand for pupation. Two to four days old host puparia were provided to *N. thymus* for parasitisation. The ratio of host and parasitoid was maintained at 4 : 1. Adult *N. thymus* emerged from the host about 20 days after parasitisation. These parasitoids were collected in large plastic containers and provided with a mixture of sucrose and honey (1:1) as diet. Female and male parasitoid ratio (1:20) was maintained (Pradip Kumar *et al.*, 1993b). The temperature and relative humidity maintained in the parasitoid culture room was $26 \pm 1^\circ\text{C}$ and 75 ± 5 per cent respectively. Such (1-2 days old) adults were released in and around the rearing houses and manure pits at the rate of one hundred thousand parasitoids for 100 Dfls rearings (about 40000 silkworm larvae) in three instalments, i.e. 8 per cent parasitoids in IV instars, 16 per cent in V instars and 76 per cent after harvest of the cocoons. Though the uzi fly infests the silkworms of III instar, the uzi fly maggots emerged from such hosts only after 7 days of infestation. Hence, the uzi fly parasitoid release was made from IV instar onwards.

The contribution of a single component (*N. thymus*) was determined during December 1992 - June 1993 by selecting rearings of two villages, Topaganahalli and Chatra for releasing of parasitoids ; rearings of Hallimarnalli village of Bangalore district served as a control (without release). Release of *N. thymus* was carried out as mentioned above. Data were collected on uzi fly infestation in the parasitoid released as well as in control villages.

Uzicide :

A liquid formulation, containing benzoic acid, acetone and water in the ratio of 2:10:80 respectively, (uzicide) was procured from the Central Sericulture Research and Training Institute (CSR & TI), Mysore, India, in one litre containers and was prepared as per the procedure of Kumar (1987). Uzicide was sprayed uniformly on silkworm larvae on alternate days after bed cleaning from III instar onwards till rippening of the silkworm larvae. Feeding was given to silkworm larvae 30 min. after uzicide spray. Total quantity required for larvae of 100 Dfls was 5 - 6 litres.

Recovery of Parasitoids :

To determine the establishment / presence of parasitoids in the released village of Gadasalli, 100 host uzi puparia of 2 days old were collected and placed in small wiremesh cages and hanged at about 2 ft height inside and outside the rearing houses. These cages were brought to the laboratory after 6-8 days. The emergence of adults was recorded from these host puparia and the percentage of infestation was calculated. Recovery of parasitoids in Gadasalli village was also made after a gap of six months

onwards from the day of stopping the release of *N. thymus*. This procedure was continued for a period of seven months during 1993 and January to March 1994.

The data collected in different silkworm rearings of treated and control villages were statistically analysed using the student T test. Significant level is at 5 %.

RESULTS AND DISCUSSION

The uzi fly infestation during different months of the year before the beginning of the programme in the area of operation ranged from 6.23 to 19.16 per cent (Av. 11.36 %). The Uzi fly infestation during the various months of the year in the treated (Uzicide and *N. thymus*) (Gadasalli village) and control (Agara village) is presented in figure 1. The same data during different seasons of the year is given in figure 2. The uzi fly infestation in the control rearings ranged from 5.15 to 18.86 per cent in different months of the year (Av. 10.12 %), whereas in the treated rearings, it ranged from 0.58 to 2.56 per cent (Av. 1.26 %) (fig. 1). The maximum infestation was noticed during the rainy and winter seasons (10.97 & 11.74 %) (fig. 2). The highest infestation of uzi fly during these seasons might be due to suitable atmospheric conditions such as temperature and humidity to the uzi fly to breed and the highest rearing activity of silkworms. On an average, the uzi fly infestation in the treated village was reduced by 87.43 per cent compared to the control. This indicates that the integration of uzicide and *N. thymus* were efficient in bringing down the infestation rate drastically. Similar results were obtained with integration of these two methods by Pradip Kumar *et al.* (1993b), who tested this method in different agroclimatical conditions of Karnataka.

The efficacy of the single component (*N. thymus*) in minimising the uzi fly infestation was determined in the rearings of two villages and the results are given in figure 3.

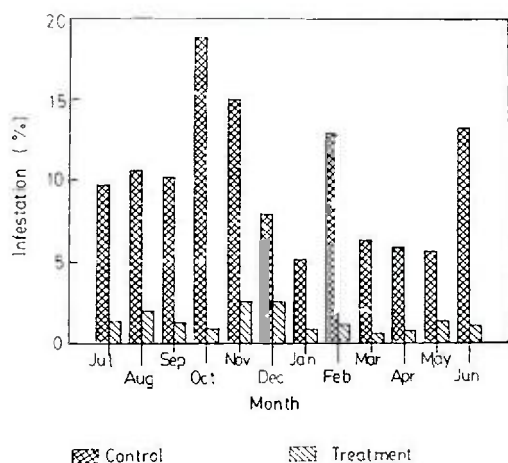


Fig. 1. Uzi fly infestation in treated village (Gadasalli) and control village (Agara).
Treatment : *N. thymus* + Uzicide.

*Fig. 1. Infestation par la mouche Uzi dans le village traité (Gadasalli) et le village témoin (Agara).
Traitement : N. thymus + Uzicide.*

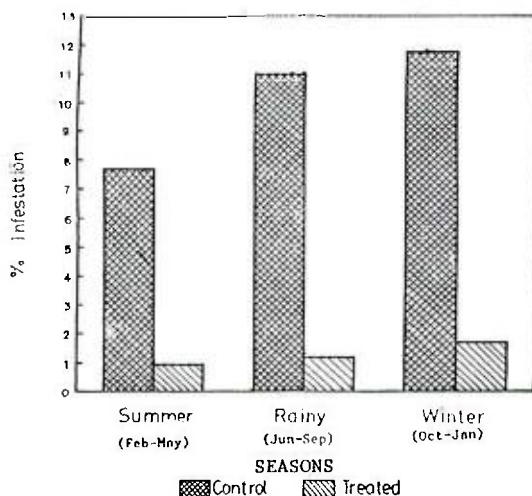


Fig. 2. Rate of Uzi fly infestation (%) in treated village (Gadasalli) and control village (Agara) during different seasons.

Fig. 2. Taux d'infestation par la mouche Uzi (%) dans le village traité (Gadasalli) et le village témoin (Agara) pendant différentes saisons.

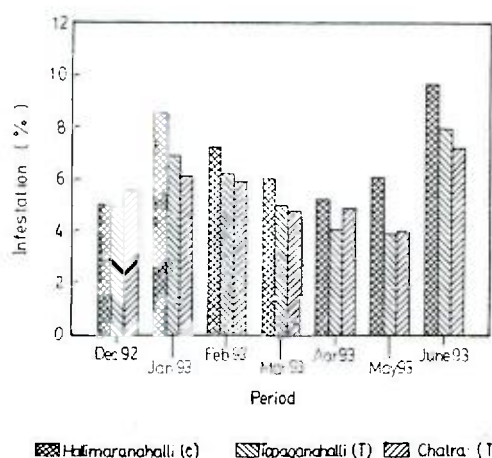


Fig. 3. Rate of Uzi fly infestation in treated (T) and control (C) villages.

Fig. 3. Taux d'infestation par la mouche Uzi dans les villages traités (T) et témoin (C).

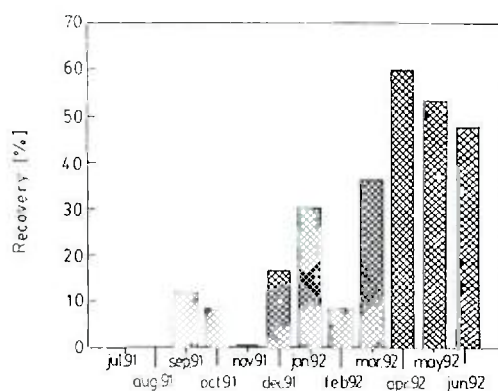


Fig. 4. Percentage of *N. thymus* recovered from the released areas.

Fig. 4. Pourcentage de *N. thymus* récupéré dans les zones de lâcher.

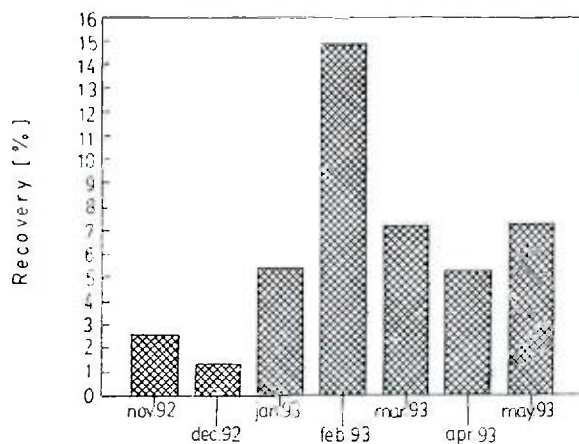


Fig. 5. Percentage of recovery of *N. thymus* after a gap of 6 months onwards from the stopping of release of *N. thymus*.

Fig. 5. Pourcentage de récupération de *N. thymus* 6 mois après sa propagation.

During the first month, the uzi fly infestation was same in the parasitoid released rearings and in control rearings. The effect of release of this parasitoid was noticed from the second month onwards. An average, uzi fly infestation to silkworm larvae in the parasitoid released rearings was 5.35 per cent, whereas it was 6.81 per cent in untreated rearings (Figure 3). Therefore, the contribution of this component was only 27.45 per cent. Pradip Kumar *et al.* (1993a) reported that the release of *N. thymus* was effective in reducing the uzi fly infestation throughout the year.

Recovery of *N. thymus* during the first two months of its release in Gadasalli village was almost nil (Fig. 4). The maximum recovery was recorded in the month of April (62 %) (Figure 4). Recovery of *N. thymus* was also made in that village after a gap of six months onwards after stopping the release of the parasitoid. The recovery percentage of the parasitoid is given in figure 5. *N. thymus* was not

recovered during 1994. It is evident from the above results that *N. thymus* can establish and propagate itself in the released villages. However, inoculative releases are necessary to maintain its population. In the light of the results, it is evident that the infestation of uzi fly can be controlled below 3 per cent in the field by integration of uzicide and the uzi fly parasitoid, *N. thymus*, which are not causing any ill effect on silkworm larvae.

ACKNOWLEDGEMENT

The author is thankful to Dr. M.R. Nirmala, Dr. H.K. Jyothi, Research Assistants, Mr. K.C. Bheemappa, Mr. B.C. Venkateshappa and Mr. G.C. Shankarappa, Feild Cum Laboratory Assistants for their assistance in carrying out this programme. The author is grateful to the Director and Divisional Chief, KSSR & DI, Bangalore for their help in providing the facilities and encouragement. The Department of Biotechnology (DBT), New Delhi, Government of India is gratefully acknowledged for financial assistance for carrying out this programme.

REFERENCES

- ANONYMOUS 1982 Workshop on Uzi fly - Proceedings, CSR & TI, Mysore, 11 p.
- BHARALI N. 1968 Some observations on fly pest infestation in muga silkworm, *Antheraea assama*. Indian J. Ser., 71 (1), 42-44.
- JAMESON A.P. 1992 Report on the disease of silkworm in India. New Delhi, India : International Books and Periodicals, 165 pp.
- JOLLY M.S. 1981 Uzi fly - its identification, prevention and control. Bulletin, CSR & TI No. 4, 1-7.
- JYOTHI H.K., VEERANNA G., NIRMALA M.R. AND GEETHABALI 1993 Relative efficacy of the parasitoids of uzi fly as biocontrol agents. In Recent advances in Uzi fly Research. Eds. G.P. Channabasavanna, G. Veeranna and S.B. Dandin. 107 -115.
- KRISHNASWAMY S. 1978 New Technology of silkworm rearing. CSR & TI Bulletin No. 2, Mysore.
- KUMAR P. 1987 Contribution to our knowledge on *Tricholyga bombycis* Beck. - a serious parasite of *Bombyx mori* L. and its control. Ph. D. thesis, Mysore University, Mysore.
- MUKHERJEE N.G. 1912 Hand Book of Sericulture, Bengal Secretariat Book Dept. Calcutta, 119 pp.
- PRADIP KUMAR, VENKATA REDDY V., SAMSON M.V. AND JOLLY M.S. 1986 Record of a new hyperparasite of *Tricholyga bombycis* Beck. (Diptera:Tachinidae) a larval parasite of *Bombyx mori* L. Curr. Scie., 55, 1040 - 1041.
- PRADIP KUMAR, SATHYA PRASAD K., RAMKISHORE, MANJUNATH D. AND DATTA R.K. 1993a. Efficiency of introduction of indigenous parasitoids against uzi fly. In Recent Advances in Uzi fly Research. Eds. G.P. Channabasavanna G., Veeranna and S.B. Dandin. 127-133.
- PRADIP KUMAR, MANJUNATH D., SATHYA PRASAD K., RAMAKISHORE, VINOD KUMAR AND DATTA, R.K. 1993b Integrated management of the uzi fly *Exorista bombycis* (Louis) (Diptera : Tachinidae) a parasitoid of silkworm, *Bombyx mori* L. Inter. J. Pest Management. 39(4), 445-448.
- VEERANNA G., NIRMALA M.R. AND MAHADEVAPPA D. 1987a Record of a new hyperparasite, *Trichopria* sp. (Hymenoptera:Diapritidae) of *Tricholyga bombycis* Beck. (Diptera : Tachinidae), a larval parasite of *Bombyx mori* L. Curr. Scie., 56 (19), 1031-1032.
- VEERANNA G., NIRMALA M.R. AND MAHADEVAPPA D. 1987b Record of new hyperparasite, *Exoristobia philippinensis* Ashmead (Hymenoptera:Encyritidae) of *Tricholyga bombycis* Beck. (Diptera : Tachinidae) a larval parasite of *Bombyx mori* L. Sericologia, 28 (6), 227-229.
- VEERANNA G. AND JYOTHI H.K. 1988 Record of a new hymenopteran parasitoid of *Tricholyga bombycis* Beck. (Diptera:Tachinidae). Curr. Scie., 57 (20), 1137-1138.

- VEERANNA G. AND JYOTHI H.K. 1994 Life table studies on *Pachycrepoideus veerannai* Nar. & Anil, a chalcid (Hymenoptera:Pteromalidae) of *Exorista sorbillans* Weid. (Diptera: Tachinidae). Entomon, 19 (1), 1-5.
- VEERANNA G. AND NIRMALA M.R. 1992 *Spalngia endius* Walker (Pteromalidae), a new parasitoid of *Exorista sorbillans* Weid. (Diptera : Tachindae). J. Boil. Control, 6(2), 93-96.
- VEERANNA G., NIRMALA M.R. AND JYOTHI H.K. 1994 Control of uzi fly - Uzi Powder (Kannada). Bulletin, KSSRDI, Bangalore.

LUTTE INTEGREE CONTRE LA MOUCHE UZI, *EXORISTA BOMBYCIS* LOUIS, UN PARASITE DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

G. VEERANNA

Entomology Unit, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute,
Thalaghattapura, Bangalore 560 062, Inde.

L'introduction d'uzicide, un ovicide et Nesolynx thymus Girault (Eulophidae), un parasite grégaire ectonymphal de la mouche uzi ont été utilisés afin de minimiser l'infestation de la mouche uzi, Exorista bombycis Louis (Tachinidae), un endoparasitoïde du ver à soie, Bombyx mori L. L'infestation de la mouche uzi dans les élevages de vers à soie contrôlés et traités dans les villages choisis est de $1,26 \pm 0,21$ % et $10,12 \pm 1,23$ % respectivement, montrant une réduction de 87,43 % de perte de récolte de vers à soie due à l'infestation par la mouche uzi ($P < 0,001$). L'application d'un seul composant (N. thymus) dans l'élevage de vers à soie de deux villages a montré un déclin significatif (27,45 %) de l'infestation par la mouche uzi sur les vers à soie en comparaison avec les élevages témoins.

INTRODUCTION

Exorista bombycis Louis (Diptera : Tachinidae), un endoparasitoïde important du ver à soie, *Bombyx mori* L. a été introduit dans le Bengale Ouest au Karnataka (Inde du Sud) par les graines de vers à soie en 1980 (Jolly, 1981). Depuis, ce parasitoïde s'est établi et cause des dommages considérables aux récoltes de vers à soie en Inde du Sud. Pendant l'étape initiale de son introduction, il avait été noté que plus de 8 % des récoltes de vers à soie étaient infestées par ce parasitoïde, menant à une récolte de seulement 5 à 10 kg de cocons pour 100 pontes, alors que normalement, la moyenne est de 40 kg (Anonyme, 1982). Après diverses recommandations, telles que des barrières de filet de nylon posées pour empêcher la ponte d'oeufs dans le corps des vers à soie, un uzicide pour tuer les oeufs dans le corps des vers à soie et une poudre pour tuer les oeufs et les larves dans le corps des vers à soie ; le taux d'infestation de la mouche uzi est de 12 - 15 % (Mukherjee, 1912 ; Jameson, 1922 ; Bharali, 1968 ; Kumar, 1987 ; Veeranna et coll., 1994)

Dans un passé récent plusieurs parasitoïdes hyménoptères du stade larvaire ou pupal de la mouche uzi (Eulophides, Encyritides, Chalcides, Pteromalides et Diapriides) ont été détruits, Pradip Kumar et coll., 1986 ; Veeranna et coll., 1987 a-b ; Veeranna et Jyothi, 1988, 1994 ; Veeranna et Nirmala, 1992). Parmi ceux-ci, *Nesolynx thymus* (Girault), un eulophide et *Dirhinus anthracia* Walker, un chalcide possèdent les meilleures caractéristiques en tant qu'agents de lutte potentiels (Jyothi et coll., 1993 ; Pradip Kumar et coll., 1993a). Dans cette étude, des efforts ont été faits afin d'intégrer un ovicide (uzicide) et *Nesolynx thymus* (un parasitoïde ectopupal grégaire) simultanément pour déterminer une double efficacité afin d'abaisser l'infestation de la mouche uzi en milieu naturel.

MATERIELS ET METHODES

Le parasitoïde ectopupal grégaire (*N. thymus*) de la mouche uzi et un ovicide liquide (uzicide) ont été simultanément utilisés dans les élevages de vers à soie dans les conditions existantes du village de Gadasalli (district de Bangalore) en 1991-92. Les élevages de vers à soie du village d'Agara (district de Bangalore) ont été utilisés en tant que 'témoins' (sans traitement). Pour faire une comparaison, le taux d'infestation de la mouche uzi a été déterminé pour les récoltes de vers à soie dans les deux zones d'opérations pendant l'année précédant celle de l'exécution de ce programme.

Elevages des vers à soie :

L'élevage des vers à soie dans un but commercial a été effectué dans les magnaneries par les sericiculteurs locaux selon la méthode de Krishnaswamy (1978). Un nombre total de 7 925 pontes saines (Dfls) (1 Dfl = 400 oeufs) ont été élevées sur différents mois au village de Gadasalli et ont été soumises à une méthode de contrôle intégrée. Un nombre total de 4 920 Dfls a été élevé au Village d'Agara en tant que témoin. Des données concernant l'infestation par la mouche uzi ont été collectées dans les élevages 'traités' et 'témoins' par les méthodes d'échantillonnages aléatoires dans différents élevages à partir du troisième jusqu'au cinquième âge, les mouches uzi préférant pondre sur les larves de ces âges.

Nesolynx thymus :

Ce parasitoïde a été élevé en grand nombre dans des flacons coniques de 1 000 ml à partir de pupes de mouches uzi provenant des marchés de cocons du gouvernement du Karnataka, lorsque les - larves ont émergé des cocons infestés. Ces larves ont été apportées au laboratoire et maintenues dans des claies d'email contenant du sable pour la pupaison. Des pupes hôtes de deux à quatre jours ont été données à *N. thymus* pour parasitisation. Le rapport hôte/parasite a été maintenu à 4 pour 1. Les adultes émergent de l'hôte environ 20 jours après la parasitisation. Ces parasitoïdes ont été rassemblés dans des grands récipients de plastique et nourris d'un mélange de sucre et de miel (1:1). Le rapport entre un parasitoïde mâle et femelle à 1 pour 20 a été maintenu (Pradip Kumar et coll., 1993b). La température et l'humidité relative maintenues dans la pièce de culture des parasitoïdes est de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ et $75 \pm 5\%$ respectivement. De tels adultes (âgés de 1-2 jours) ont été lâchés à l'intérieur et autour des magnaneries ainsi que des fosses à purin au taux de 100 000 parasitoïdes pour des élevages de 1000 Dfls (environ 40 000 larves de vers à soie) en trois tranches d'âges, c'est à dire 8% de parasitoïdes du quatrième âge, 16 % au cinquième âge et 76 % après la récolte des cocons. Puisque la mouche uzi infeste le ver à soie au III^e âge, les larves de mouche uzi émergent de ces hôtes seulement 7 jours après l'infestation. Le lâchage du parasitoïde de la mouche uzi a été effectué au IV^e âge.

La contribution d'un seul composant (*N. thymus*) a été déterminée entre décembre 1992 et juin 1993 par la sélection de deux villages d'élevages, Topaganahalli et Chatra pour le lâchage de parasitoïdes ; les élevages du village de Hallimamalli du district de Bangalore ont servi de 'témoins' (pas de lâchage de parasitoïdes). Le lâchage de *N. thymus* a été effectué comme nous l'avons indiqué plus haut. Les données ont été relevées concernant l'infestation de la mouche uzi chez les villages avec lâchage ainsi que dans les villages 'témoins'.

Uzicide :

Une formule liquide, contenant de l'acide benzoïque, de l'acétone et de l'eau au taux de 2:10:80 respectivement, (uzicide) a été fournie par le 'Central Sericulture Research and Training Institute' (CSR & TI), Mysore, Inde, dans des récipients d'un litre et a été préparée selon le procédé de Kumar (1987). L'uzicide a été diffusé uniformément sur les larves de ver à soie en alternance, après le nettoyage des litières à partir du troisième âge jusqu'à la maturité des larves. Trente minutes après la diffusion de l'uzicide, les vers à soie ont été nourris. Le quantité totale nécessaire pour des larves de 100 Dfls est de 5-6 litres.

Récupération des parasitoïdes :

Pour déterminer l'établissement / la présence des parasitoïdes dans le village de Gadasalli, 100 pupariums d'uzi hôtes âgés de deux jours ont été collectés et placés dans des petites cages, suspendues à environ deux pieds du sol à l'intérieur et à l'extérieur des magnaneries. Ces cages ont été transportées au laboratoire après 6-8 jours. L'émergence d'adultes a été notée à partir de ces pupariums hôtes et le pourcentage d'infestation a été calculé. La récupération des parasitoïdes au village de Gadasalli a été faite après une période de six mois à partir du dernier lâchage de *N. thymus*. Cette procédure a été renouvelée sur une période de sept mois en 1993 et de janvier à mars 1994.

Les données relevées dans les différents élevages de vers à soie des villages 'traités' et 'témoins' ont été analysées statistiquement à l'aide du test T. Le niveau significatif est à 5 %.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'infestation de la mouche uzi lors de différents mois de l'année avant le début du programme dans la zone de l'opération varie de 6,23 à 19,16 % (Moyenne 11,36%).

L'infestation de la mouche uzi lors des différents mois de l'année dans les villages traités (uzicide et *N. thymus*) (Gadasalli village) et les villages 'témoins' (Agara village) est présentée dans la figure 1. Les mêmes données lors des différentes saisons de l'année sont indiquées dans la figure 2. L'infestation par la mouche uzi dans les élevages 'témoins' varie de 5,15 à 18,86 % sur différents mois de l'année (Moyenne 10,12 %), alors que dans les élevages traités, elle varie entre 0,58 à 2,56 % (Moyenne 1,26 %) (figure 1). L'infestation maximale a été notée lors des saisons pluvieuses et hivernales (10,97 et 11,74 %) (figure 2). Le taux le plus élevé d'infestation par la mouche uzi pendant ces saisons peut être due à de bonnes conditions climatiques au niveau de la température et de l'humidité qui conviennent à la ponte des mouches uzi et correspond au plus fort de l'élevage des vers à soie. En moyenne, l'infestation par la mouche uzi dans le village traité a été réduite de 87,43 % en comparaison avec le village témoin. Cela nous montre que l'intégration d'uzicide et *N. thymus* ont été efficaces par la baisse importante du taux d'infestation. Des résultats similaires ont été obtenus par l'intégration de ces deux méthodes par Pradip Kumar et coll. (1993b), qui avaient testé cette méthode dans des conditions agroclimatiques différentes de celle du Karnataka.

L'efficacité d'un seul composant (*N. thymus*) en minimisant l'infestation de la mouche uzi a été déterminée dans les élevages des deux villages et les résultats sont données dans la figure 3.

Lors du premier mois, l'infestation par la mouche uzi est identique aux élevages où l'on a lâché les parasitoïdes et dans les élevages témoins. L'effet du lâchage de parasitoïdes a été noté à partir du deuxième mois. En moyenne, l'infestation par la mouche uzi des larves de vers à soie pour les parasitoïdes lâchés était de 5,35 %, alors qu'elle était de 6,81 % dans les élevages non traités (Fig. 3). Donc, la contribution du composant est de seulement 27,45 %. Pradip Kumar et coll. (1993a) a signalé que le lâchage de *N. thymus* est efficace car réduisant l'infestation par la mouche uzi tout au long de l'année.

Le retour de *N. thymus* lors des deux premiers mois du lâchage au village de Gadasalli était presque nul (Fig. 4). Le retour maximal a été noté au mois d'avril (62 %) (Fig. 4). Le retour de *N. thymus* a été aussi observé dans ce village après une pause de six mois suivant l'arrêt du lâchage de parasitoïdes. Le pourcentage de retour du parasitoïde est indiqué dans la figure 5. *N. thymus* n'est pas réapparu en 1994. Il est évident, par rapport aux résultats ci-dessus, que *N. thymus* peut s'établir et proliférer dans les villages où l'on en a lâché.

Cependant, des lâchages de *N. thymus* réitérés sont nécessaires pour maintenir sa population.

A la lumière de ces résultats, il est possible que l'infestation de la mouche uzi puisse être maintenue en dessous de 3 % en milieu naturel par l'intégration d'un uzicide et du parasite de la mouche uzi, *N. thymus* qui ne cause aucune maladie sur la larve du ver à soie.

STUDIES ON THE FEEDING POTENTIAL OF A COCCINELLID PREDATOR, *NEPHUS* SP. ON PINK MEALY BUG, *MACONELICOCCLUS HIRSUTUS* (GREEN)

N. CHAKRABORTY, M. V. SANTHA KUMAR AND S.K. SEN

Division of Entomology, Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742 101, India.

In mulberry ecosystem, a Coccinellid, Nephus sp. (1) has been reported for the first time as a potential predator of Maconellicoccus hirsutus (Green) (Hemiptera: Pseudococcidae) causing tukra in mulberry under West Bengal conditions. Investigation on its feeding efficacy revealed that the predator during its grub and adult stages feeds on all developmental stages of the pest. The laboratory studies conducted under 25-28°C and 65-70 % R.H. indicated that each grub of Nephus sp. devoured 1 379.8 eggs or 70.3 nymphs or 13 adults of M. hirsutus. An adult female predator consumed 3 441.1 eggs or 533.3 nymphs or 112.5 adults of mealy bug, whereas an adult male predator consumed 2 067.2 eggs or 409.7 nymphs or 66.4 adults of the prey.

Keywords : Mealy bug, biological control, predator, feeding potential.

INTRODUCTION

Mulberry being perennial plant, harbours several diseases and pests throughout the year with seasonal variations (Rangaswami *et al.*, 1976). Amongst the pests, pink mealy bug, *Maconellicoccus hirsutus* (Green) (Hemiptera: Pseudococcidae) (Fig. 1) is regarded as one of the major pests causing considerable loss of mulberry leaf yield in terms of both quality and quantity (Raichoudhury, 1958). *M. hirsutus*, a polyphagous insect is reported to attack 28 plant species in India and more than 125 plant species the world over (Anonymous, 1993). The mealy bug infestation results in stunted growth leading to reduction of leaf yield by about 500-2,000 kg/Acre/Year (Anonymous, 1993).

The pink mealy bug is popularly designated as hard-to-kill pest as it becomes less accessible to the spray of chemical insecticides due to its habit and body adaptation. In view of the above aspects and to combat "Tukra" menace effectively, a continuous search was made to find out native predators in mulberry fields of West Bengal. Continuous screening of Tukra infested shoots led to the discovery of a native predator, *Nephus* sp. Biology of this species was worked out by Santha Kumar *et al.* (1994).

The need for improving and expanding the use of biocontrol agents is well recognised. Research must be continued on the biology, ecology and behaviour of biotic agents for using them more effectively in pest control (Raheja, 1993). An important question that helps farmers make pest management decisions concerns the number of prey eaten. Each study group in Farmer Field School (FFS) or Transfer of Technology (TOT) session may select the number of prey used in the study and at the end of a day, the farmers or trainers will count the number of prey eaten. The results when discussed among the participants will help them understand how natural enemies in general and predators in particular are able to keep pest population in check (Ooi, 1996).

With a view to explore the possibilities of recommendation of this predator for management of mealy bug population, the present study was conducted on the feeding potential of *Nephus* sp. on

different stages of *M. hirsutus*. In addition to *M. hirsutus*, the host range of present predator includes citrus mealy bug, *Planococcus citri* Risso, white tailed mealy bug, *Ferrisia Virgata* and scale insects of other plants.

MATERIALS AND METHODS

Experiments were conducted to determine the feeding efficacy of grubs (Fig. 3) and adults (Fig. 4 and 5) of *Nephus* sp. on different developmental stages of *M. hirsutus* (eggs, nymphs and adults) under laboratory conditions at 25 to 28°C temperature and 65 to 70 % relative humidity. After hatching, each predator grub was kept in a glass vial (5.5 x 5.5 x 1.8 cm) and provided with a known number of preys. Observation was taken on the number of preys eaten at every 24 hours. Surviving preys were counted and removed. Fresh preys were offered to the predatory grub everyday until pupation. Number of prey consumed by the predatory grub in each instar and also the total number consumed by a grub and an adult were calculated. The feeding potential studies were conducted with 10 predatory grubs, adult males and adult females where each individual was considered as one replicate. The collected data in the form of replications were pooled and mean data with standard deviations are presented (Mani and Thontadarya, 1987a) in Table I.

RESULTS AND DISCUSSION

Feeding efficacy of grubs and adults of *Nephus* sp. on different developmental stages of *M. hirsutus* is furnished in Table I. The number of mealy bug eggs consumed by the first, second, third and fourth instar grubs averaged 28.9 ; 52.1 ; 241.8 and 1,057 respectively. A total of 1,379.8 eggs of *M. hirsutus* were consumed by a grub during its development. This finding is at variance with Whitcomb (1940), Oncuer and Baylan (1982), and Mani and Thontadarya (1987a) who have reported respectively that the grub of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) consumed 1,325 and 3,330 eggs of *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae) and 881.3 eggs of *Maconelllicoccus hirsutus* (Green). Mani and Thontadarya (1987b) worked out the feeding efficiency of a grub of *Scymnus coccivora* Ayyar (Coleoptera: Coccinellidae) on the eggs of *M. hirsutus* as 44.10 ; 40.75 ; 64.35 and 158.50 during four instars respectively. Among the larval instars, fourth instar grub was voracious of all, devouring highest number of mealy bug eggs. Similar observations were made by Satyanarayanamurthy (1982) ; and Mani and Thontadarya (1987a) in *C. montrouzieri*. The maximum number of mealy bug eggs (325.5) were consumed during fourth day of the final instar grub of the present predator.

In the present investigation, a grub consumed 3.1 ; 7.3 ; 13.9 and 46 nymphs of mealy bug during first, second, third and fourth instars respectively. The maximum predation (14.2) was observed on the third day of fourth instar. A predatory grub consumed a total of 70.3 nymphs during its larval period. Mani and Thontadarya (1987a and b) reported that a grub of *C. montrouzieri* and *S. coccivora* consumed 259 and 62.20 nymphs respectively. The number of adult female mealy bugs consumed by a grub of *Nephus* sp. during its first, second, third and fourth instar was 1 ; 1.3 ; 3.4 and 7.3 respectively. The total number of female mealy bugs consumed by a grub was 13 with an average consumption of 1.44 per day. Number of adult mealy bugs required for a grub was less than that of nymphs due to larger body size. The feeding efficacy of grubs of *C. montrouzieri* and *S. coccivora* was 1.65 ; 3.35 ; 7.90 and 14.65 ; and 1.10 ; 1.20 ; 1.75 and 2.50 during first, second, third and fourth instars respectively, on adult females of *M. hirsutus* (Mani and Thontadarya, 1987a and b).

Table I. Feeding potential of different life stages of *Nephus* sp. on *M. hirsutus*.

Tableau I. Potentiel d'alimentation au cours des différents stades de la vie de *Nephus* sp. sur *M. hirsutus*.

Life stage of <i>Nephus</i> sp.	Prey consumption (Mean number S.D.) Consommation des proies (Nombre moyen E.T.)		
Stade de vie de <i>Nephus</i> sp.	Eggs Oeufs	Nymphs Nymphe	Adults Adultes
Larval instars Âges larvaires			
(I)	28.9 ± 8.710	3.1 ± 1.136	1.0 ± 0.000
(II)	52.1 ± 17.430	7.3 ± 2.326	1.3 ± 0.458
(III)	241.8 ± 55.870	13.9 ± 2.809	3.4 ± 0.663
(IV)	1 057.0 ± 70.000	46.0 ± 5.790	7.3 ± 1.187
Total	1 379.8 ± 29.563	70.3 ± 8.161	13.0 ± 1.483
Adult Female <i>Femelle Adulte</i>	3 441.1 ± 111.700	533.3 ± 22.090	112.5 ± 5.660
Adult Male <i>Mâle Adulte</i>	2 067.2 ± 30.096	409.7 ± 19.440	66.4 ± 3.290



Fig. 1. Tukra infected mulberry shoot showing mealy bug colony.

Fig. 1. Pousse de mûrier infestée par une colonie de cochenilles.



Fig. 2. Tukra infected mulberry shoot external view.

Fig. 2. Pousse de mûrier infestée par le tukra - vue externe.

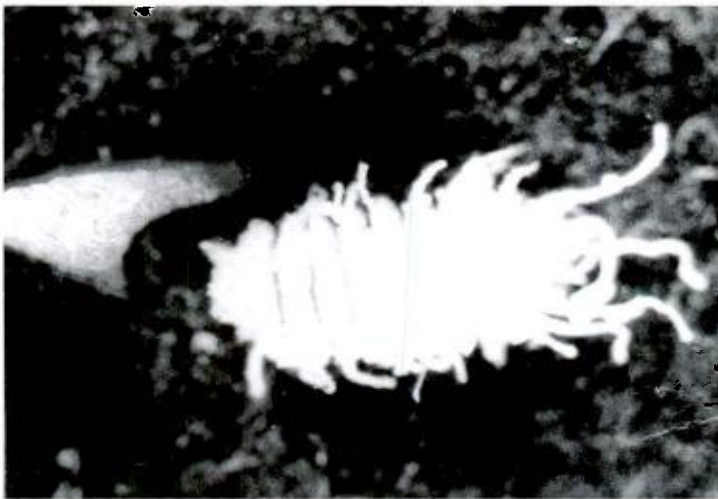


Fig. 3. Fourth instar grub of *Nephus* sp.

Fig. 3. Larves de Nephus sp. au quatrième âge.

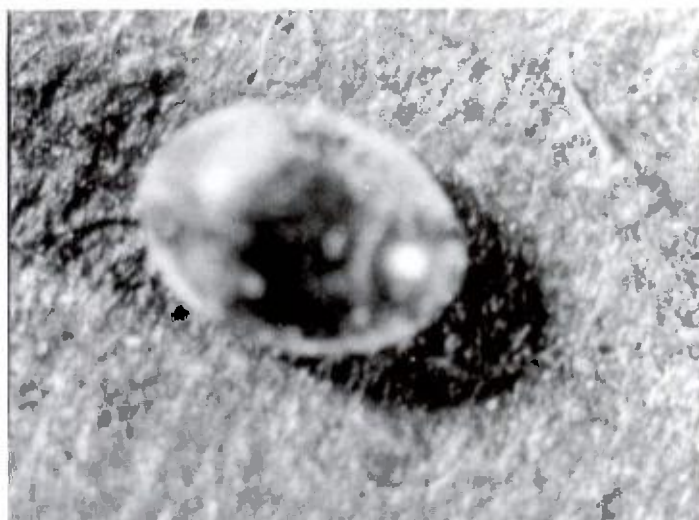


Fig. 4. Adult male of *Nephus* sp.

Fig. 4. Mâle adulte de *Nephus* sp.



Fig. 5. Adult female of *Nephus* sp.

Fig. 5. Femelle adulte de *Nephus* sp.

Buntin and Tamaki (1980) reported that, first instar grub of *Scymnus marginicollis* (Coleoptera : Coccinellidae) didn't feed on the adults of aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera : Aphididae). Whereas the other three instars consumed a total of 16 aphids which were substantially lesser than the number recorded for other Coccinellids. Kapur (1942) reported the feeding efficacy of two Coccinellids, *Brunus suturalis* (Fabricius) and *Scymnus quadrillum* Mots. on aphids, *Hyalopterus atriplicis* and *Aphis laburnii*. Grub of *B. suturalis* consumed 10 to 15 adult aphids per day during fourth instar, whereas a grub of *S. quadrillum* consumed 8 to 14 aphids per day. In the present investigation the mean consumption of grub of *Nephus* sp. (1) was 106.1 eggs or 6.39 nymphs or 1.4 adults per day.

A female beetle of *Nephus* sp. (1) consumed 3,441.1 eggs or 533.3 nymphs or 112.5 adults of *M. hirsutus*, whereas a male beetle consumed 2,067. 2 eggs or 409.7 nymphs or 66.4 adults (Table I).

Thus, in adult stage, feeding efficacy of female is more than that of male. This finding is coinciding with the observation made by Kapur (1942), who reported that female and male of *S. marginicollis* consumed an average of 5.27 and 2.74 aphids per day, respectively. The observation made by Jayaraman *et al.*, (1988) in *C. montrouzieri* also supports the present finding. The maximum consumption by grubs of *Nephus* sp. (1) on eggs, nymphs and adult females of *M. hirsutus* was observed during the final day of fourth instar. A female predator preyed maximum on eggs (78.8), nymphs (16.8) and adults (2.7) of host on 22nd day, 36th day and 25th day respectively. A male predator preyed maximum eggs (57) and nymphs (13) on 18th day and maximum adults (2.2) on 21st day. As the predator is having higher longevity and fecundity (Santha Kumar *et al.*, 1994), good searching ability in the tukra infested shoots and feeding on all stages of mealy bug, it is considered to be an ideal tool to be used for biological control of mealy bug. Further studies on standardization of mass multiplication and field efficacy of the predator will be helpful to plan the effective management strategies for the control of mealy bug as well as tukra incidence in mulberry.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to the Director, CSR & TI, Berhampore, for providing facilities, International Institute of Entomology, London for identifying the predator, Mr. A.P.V. S. Vara Prasad, Computer Programmer, Mr. Debasish Roy, Artist and Mrs Indira Roy for technical assistance.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1993) Integrated management against mealy bug - a serious pest of mulberry. *Tech. Bull.*, Pest Management Laboratory, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, pp. 6
- BUNTIN L.A., TAMAKI G. (1980) Bionomics of *Scymnus marginicollis* (Coleoptera : Coccinellidae). *Can. Ent.*, 112, 675-680.
- GOVINDAIAH, BAKHUNI B.S. (1988) Prevalence of tukra disease of mulberry in tropical regions. *Indian. Silk*, 26 (11), 55-56.
- JAYARAMAN V., CHANDRA MOHAN N., GOPALAN M., BALA SUBRAMANIAN G. (1988) Predatory potential of Coccinellid beetles on mealy bugs of citrus and grapevine. *Madras Agri. J.*, 75 (1-2), 77-78.
- KAPUR A.P. (1942) Bionomics of some Coccinellidae predaceous on aphids and coccids in North India. *Indian. J. Entomol.*, 4, 49-66.
- MANI M., THONTADARYA T.S. (1987a) Development and feeding potential of Coccinellid predator, *Cryptolaemus montrouzieri* Muls. on the grape mealybug, *Maconellicoccus hirsutus* (Green). *J. Biol. Control.*, 1 (1), 19-22.
- MANI M., THONTADARYA T.S. (1987b) Biological studies on the grapevine mealy bug predator, *Scymnus coccivora* Ayyar (Coccinellidae : Coleoptera). *J. Biol. Control.*, 1 (2), 89-92.
- MANJUNATH D., PRADIP KUMAR, RAM KISHORE, SATHYA PRASAD K., NARAYANASWAMY K.C., DATTA R. K. (1993) Towards understanding Tukra and its management. *Indian Silk*, 7, 6-9.
- MUKHERJEE N.G. (1919) Handbook of Sericulture. Bengal Secretariate Press, Calcutta, pp. 121-127.
- OOI, P.A.C. 1996. Experiences in educating rice farmers to understand Biological control. *Entomophaga*, 40 (3/4), 375-385.
- ONCUER C., BAYLAN N. (1982) An investigation into the feeding capacity of *Cryptolaemus montrouzieri*. *Türkiye Bitki Koruma Dergisi*, 6, 85-90.
- RAHEJA, A.K. (1993) Current status and future thrusts for Integrated Pest management in India. *J. Insect. Sci.* 6 (1), 1-6.
- RAICHOUDHURY D.P. (1958) A short note on the study of "Tukra disease" of mulberry (*Morus spp.*) caused by *Phenococcus hirsutus* Gr. (Coccidae). *Journal of Silkworm*, 10 (4), 315-318.

- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M.N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C.R. (1976) *Manual on Sericulture. Vol. I. Mulberry Cultivation*. FAO, Rome, p.78.
- RAO A.A., TEOTIA R.S., CHAUHAN S.S., CHAKRABORTY S., SUBBA RAO G. (1993) Studies on the seasonal incidence of the mealy bug (*Maconellicoccus hirsutus* Green) causing tukra on mulberry in West Bengal. *Indian J. Seric.*, 32 (1), 111-113.
- SANTHA KUMAR M.V., CHAKRABORTY N., SAHA KUNDU A.K. (1994) Biology of *Nephus* sp. (1) (Coleoptera : Coccinellidae), the native predator of pink mealy bug, *Maconellicoccus hirsutus* (Green) (Hemiptera : Pseudococcidae). *Biol. Control Ins. Pests*, pp. 91-95.
- SATYANARAYANAMURTHY M. (1982) Studies on the biology and habits of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coccinellidae : Coleoptera). M.Sc. (Ag) Thesis, Andhra Pradesh Agric. Univ., Hyderabad, pp. 72.
- SRIHARAN T.P., SAMSON M. V., KRISHNASWAMI S. (1979) Studies on tukra disease of mulberry. *Indian J. Seric.*, 18, 78.
- WHITCOMB W.D. (1940) Biological control of mealy bug in green houses. *Bull. Massachu. Agric. Expt. Stn.*, USA, No. 375, pp. 22.

ETUDES SUR LE POTENTIEL ALIMENTAIRE D'UN COCCINELLIDE PREDATEUR, *NEPHUS* SP., SUR LA COCHENILLE ROSE, *MACONELLYCOCCUS HIRSUTUS* (GREEN)

N. CHAKRABORTY, M. V. SANTHA KUMAR & S.K. SEN

Division of Entomology Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore 742 101,
Inde.

*Dans l'écosystème du mûrier, un coccinellide, *Nephus* sp., a été remarqué pour la première fois, comme un prédateur potentiel de *Maconellycoccus hirsutus* (Green) (Hemiptera : Pseudococcidae) causant le tukra du mûrier sous les conditions climatiques du Bengale Ouest. Une étude concernant son efficacité alimentaire a révélé que le prédateur se nourrit du parasite lors de toutes les étapes de son développement. Les études conduites en laboratoire à une température en dessous de 25-28°C et 65-70 % RH ont montré que chaque larve de *Nephus* sp. dévore 1 379,8 oeufs ou 70,3 nymphes ou 13 adultes de *M. hirsutus*. Un prédateur adulte femelle consomme 3 441,1 oeufs ou 533,3 nymphes ou 112,5 cochenilles adultes, alors qu'un prédateur adulte mâle en consomme 2 067,2 oeufs ou 400,9 nymphes ou 66,4 adultes.*

INTRODUCTION

Le mûrier étant une plante vivace, il porte à cause des variations saisonnières, tout le long de l'année, de nombreuses maladies et parasites (Rangaswami et coll., 1976). Parmi ces parasites, la cochenille rose, *Maconellycoccus hirsutus* Green (Hemiptera : Pseudococcidae) (Fig. 1) est considérée comme un des parasites les plus importants causant une perte considérable de feuilles de mûrier en terme de quantité et de qualité (Raichoudhury, 1958). *M. hirsutus*, un insecte polyphage est signalé attaquer 28 espèces de plantes en Inde et plus de 125 espèces de plantes à travers le monde (Anonyme, 1993). L'infestation par les cochenilles parasites donne une croissance retardée qui réduit le rendement en feuilles l'environ 50-2 000 kg/Acre/Année (Anonyme, 1993).

La cochenille rose est considérée comme un parasite difficile à exterminer car elle est de moins en moins sensible aux insecticides, ceci est due à l'accoutumance aux pesticides et à sa capacité d'adaptation. En considérant les aspects décrits ci-dessus, et afin de combattre efficacement la menace tukra, une recherche continue a été entamée afin de trouver des prédateurs originaires des mûraies du Bengale Ouest. L'évaluation continue des branches infestées de tukra a permis de découvrir un prédateur indigène, *Nephus* sp. La biologie de ces espèces avait été étudiée par Santha Kumar et coll. (1994).

Le besoin d'améliorer et de répandre l'utilisation d'agents de lutte biologique est bien reconnu.

La recherche ne doit pas être stoppée pour ce qui concerne la biologie, l'écologie et le comportement de ces agents biotiques afin de les utiliser d'une manière plus efficace pour contrôler des parasites (Raheja, 1993). Une question importante qui permet aux cultivateurs de prendre des décisions concernant la gestion des parasites concerne le nombre de proies mangées. Chaque groupe d'étude du Farmer Field School (FFS) ou du Transfert de Technologie (ToT) peut sélectionner le nombre de proies utilisées dans l'étude et en fin de journée, les éleveurs ou formateurs compteront le

nombre de proies mangées. Les résultats, lorsque ils seront discutés avec les participants, les aideront à comprendre comment des ennemis naturels en général et les prédateurs en particuliers sont capables de mettre en échec une population de parasites (Ooi, 1996).

Avec l'intention d'explorer toutes les possibilités pour recommander ce prédateur pour la gestion de la population de cochenilles, cette étude a été menée par rapport au potentiel alimentaire de *Nephus* sp. au cours des différents stades de *M. hirsutus*. En plus de *M. hirsutus*, ce prédateur peut avoir pour hôte la cochenille du citrus, *Planococcus citri* Risso, la cochenille blanche, *Ferrisia Virgata* et une série d'insectes d'autres plantes.

MATERIELS ET METHODES

Des expériences ont été menées afin de déterminer le potentiel alimentaire des larves (Fig. 3) et des adultes (Fig. 4 et 5) de *Nephus* sp. à différentes étapes de développement du *M. hirsutus* (oeufs, nymphes et adultes) dans des conditions de laboratoire de 25 à 28 °C et 65 à 70 % d'humidité relative. Après la ponte, chaque larve 'prédatrice' a été placée dans une fiole de verre (5,5 × 5,5 × 1,8 cm) et nourrie d'un nombre précis de proies. Les observations ont été faites sur le nombre de proie mangées toutes les 24 heures. Les proies survivantes ont été comptées puis ôtées. De nouvelles proies ont été offertes aux larves 'prédatrices' tous les jours jusqu'à la pupaison. Le nombre de proies consommées par les larves du prédateur à chaque stade larvaire et aussi le nombre total consommé par une larve et un adulte ont été calculés. Les études de potentiel alimentaire ont été menées avec 10 larves et adultes mâles et femelles, chaque individu étant considéré comme une répétition. Les données collectées dans la ferme ont été groupées et les données moyennes avec les écarts types sont présentés dans le tableau I (Mani et Thontadarya, 1987a).

RESULTATS ET DISCUSSION

L'efficacité alimentaire des larves et des adultes de *Nephus* sp. (1) sur différents stades de développements de *M. hirsutus* est exposée dans le tableau I. Le nombre d'oeufs de cochenilles consommés par les larves du premier, second, troisième et quatrième stades larvaires atteint la moyenne de 28,9 ; 52,1 ; 241,8 et 1 057 respectivement. Un total de 1 379,8 oeufs de *M. hirsutus* a été consommé par une larve pendant son développement. Ce résultat est différent de ceux obtenus par Whitcomb (1940), Oncuer et Baylan (1982), et Mani et Thontadarya (1987a) qui respectivement avaient noté que la larve de *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera : Coccinellidae) avait consommé 1 325 et 3 330 oeufs de *Planococcus citri* Risso (Hemiptera : Pseudococcidae) et 881,3 oeufs de *Maconellicoccus hirsutus* (Green). Mani et Thontadarya (1987b) ont évalué l'efficacité de la larve de *Scymnus coccivora* Ayyar (Coleoptera : Coccinellidae) sur les oeufs de *M. hirsutus*, soit 44,10 ; 40,75 ; 64,35 et 158,500 pendant les quatre âges larvaires respectivement.

Parmi les stades larvaires, la larve du quatrième stade est la plus vorace, dévorant le nombre le plus élevé d'oeufs de cochenilles. Des observations similaires ont été faites par Satyanarayanamurthy (1982) et Mani et Thontadarya (1987a) chez *C. montrouzieri*. Le nombre maximum d'oeufs de cochenilles (325,5) a été consommé pendant quatre jours du dernier stade larvaire de ce prédateur.

Dans cette étude, une larve a consommé 3,1 ; 7,3 ; 13,9 et 46 nymphes de cochenilles pendant les premier, second, troisième et quatrième stades larvaires respectivement. La prédation maximale (14,2) a été observée au troisième jours du quatrième stade larvaire. Une larve 'prédatrice' consomme un total de 70,3 nymphes pendant sa période larvaire. Mani et Thontadarya (1987a et b) ont noté qu'une larve de *C. montrouzieri* et *S. coccivora* consommait 259 et 62,20 nymphes respectivement. Le nombre de cochenilles adultes femelles consommé par une larve de *Nephus* sp. pendant son premier, second, troisième et quatrième stade larvaire est de 1 ; 1,3 ; 3,4 et 7,3 respectivement. Le nombre total de cochenilles femelles consommées par une larve est de 13 avec une consommation moyenne de 1,44 par jours. Le nombre de cochenilles adultes nécessaire pour une larve est moins

important que pour des nymphes, ceci étant due à la taille plus importante de ces dernières. L'efficacité alimentaire des larves de *C. montrouzieri* et *S. coccivora* est de 1,65 ; 3,35 ; 7,9 et 14,65. Pendant le premier, second, troisième et quatrième stades larvaires, l'efficacité est respectivement de 1,10 ; 1,20 ; 1,75 et 2,50 sur des adultes femelles de *M. hirsutus* (Mani et Thontadarya, 1987a et b).

Buntin et Tamaki (1980) ont noté que la larve du premier stade larvaire de *Scymnus marginicollis* (Coleoptera : Coccinellidae) se nourrit de pucerons adultes, *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera : Aphididae). Alors que les trois autres stades larvaires consomment un total de 16 pucerons, ce qui est bien moindre par rapport au nombre noté pour les autres coccinellides. Kapur (1942) a évalué l'efficacité alimentaire de deux coccinellides, *Brumus suturalis* (Fabricius) et *Scymnus quadrimaculatus* Mots. sur les pucerons, *Hyalopecterus atriplicis* et *Aphis laburnii*. Des larves de *B. suturalis* consomment de 10 à 15 pucerons adultes par jours pendant quatre stades larvaires, alors qu'une larve de *S. quadrimaculatus* consomme 8 à 14 pucerons par jours. Dans notre étude, la consommation moyenne de larves de *Nephus* sp. est de 106,1 oeufs ou 6,39 nymphes ou 1,4 adultes par jour.

Une femelle *Nephus* sp. consomme 3 441,1 oeufs ou 533,3 nymphes ou 66,4 adultes de *M. hirsutus*, alors qu'un mâle *Nephus* sp. consomme 3 067,2 oeufs ou 409,7 nymphes ou 66,4 adultes (Tableau I). Donc, lors du stade adulte, l'efficacité d'alimentation de la femelle est plus importante que celle du mâle. Ce résultat coïncide avec l'observation de Kapur (1942), qui avait noté que mâles et femelles de *S. marginicollis* avaient consommé une moyenne de 5,27 et 2,74 pucerons par jour, respectivement. Les observations faites par Jayaraman et coll., (1988) chez *C. montrouzieri* confirment les résultats présents. La consommation maximale d'oeufs, de nymphes et d'adultes femelles de *M. hirsutus* par des larves de *Nephus* sp. a été observée lors du dernier jour de son quatrième stade larvaire. Un prédateur femelle se nourrit d'un maximum d'oeufs (78,8), nymphes (16,8) et adultes (2,7) d'hôtes au 22^{ème} jours, 36^{ème} et 25^{ème} jour respectivement. Un mâle prédateur se nourrit d'un maximum d'oeufs (57) et de nymphes (13) au 18^{ème} jours et un maximum d'adultes (2,2) au 21^{ème} jour. Comme le prédateur a une plus grande longévité et fécondité (Santha Kumar et coll. 1994), et une bonne recherche concernant les pousses infestées de tukra et nourrissant tous les stades de la cochenille, il peut être considéré comme un outil idéal pour un contrôle biologique de la cochenille. Des études approfondies sur la standardisation de la multiplication de masse et l'efficacité des prédateurs sera utile pour planifier les stratégies pour le contrôle des cochenilles ainsi que l'incidence du tukra sur le mûrier.

BREEDING OF BIVOLTINE SILKWORM RACES WITH BETTER SURVIVAL AND HIGH SHELL CONTENT FOR TROPICS - KARNATAKA

B.M. SEKHARAPPA, P.G. RADHAKRISHNA, K.S. KESHAVAREDDY & S.B. DANDIN

KSSR & DI Thalaghattapura, Bangalore - 560 062, India.

The requirement of bivoltine silkworm varieties with better survival and higher shell content over the present commercial bivoltines is very much felt by tropical state like Karnataka which is the highest silk producing state in India. The silkworm genotypes of different geographical origin were used as source material for the present work. Inbreeding and segregation methods were applied to isolate the lines in the present study. One peanut line namely NTC-M from Thailand hybrid and one oval line from Chinese hybrid were identified with 20-21 % shell content. The hybrids of these lines have shown encouraging performance both at laboratory and in the field through better yield (2-3 kg more), higher cocoon price (Rs. 160) and lower renditta of 6.5-7.0 kg with significant improvement in the fiber characters (> 92 points). This paper will discuss the breeding plan and performance of both pure and hybrids through seasons.

Keywords : *Bombyx mori*, hybrids, breeding, selection, performance

INTRODUCTION

Silkworm rearing is more than 4 000 years old agrobased industry. The interaction of environment with silkworm genotypes have resulted in many varieties with specific characters like univoltines, bivoltines (under temperate and subtropical conditions) and polyvoltines (under tropical conditions) (Hirobe, 1968). These varieties display genetic, physiological, ethological, morphological and quantitative differences (Yokoyama, 1979 ; Gamo & Ohtsuka, 1980 ; Gamo, 1983). The univoltines and bivoltines are known for better quantitative characters with quality silk and they are sensitive to environmental and dietary stress. The polyvoltines are tolerant to these stress with poor yield and low quality of silk (Anonymous, 1985). Large number of breeding efforts were made since many years to improve the beneficial traits to suit the tropical conditions which has resulted in many new silkworm lines (Jolly, 1983 ; Datta, 1984). Continuous inbreeding and interaction with environment has resulted in inbred depression (Faster, 1969). Bivoltines are being used for the preparation of cross breeds with polyvoltines to achieve better mid parental value. However, consistent attempts are being made to evolve superior bivoltines to suit the tropical conditions. In the light of these facts an attempt has been made in the present study to evolve races (peanut and oval) having superior characters for the commercial exploitation under tropical conditions.

MATERIALS AND METHODS

Simultaneously, two breeding programs were initiated using F1 hybrids procured from Thailand and China. The F1 and F2 hybrids were reared in mass along with the popular bivoltine hybrids

(KA $\times$ NB4D2 & NB4D2 $\times$ KA) following the standard rearing procedure (Krishnaswami, 1978). From F2 generation, the Thailand hybrid segregated into marked and plain larvae. The plain and marked larvae were isolated and reared separately. The isolated batches have spun both peanut and oval shaped cocoons. The Chinese hybrid has not shown segregation for the larval markings and spun both peanut and oval shaped cocoons. The peanut and oval shaped cocoons were isolated and maintained separately. From F3 generation, cellular method of rearing was followed with six replications till the completion of F10 generation. Strict selection parameters were applied at different stages of development to isolate the lines. Interbred or intrabred crossing method was followed to achieve the maximum traits. A line, spinning peanut shaped cocoons from Thailand hybrid and line spinning oval cocoons from Chinese hybrid showing better performance for all the traits were selected for further evaluation. The selection and isolation pattern is shown in the breeding plan (fig. 1 & 2). The hybrid combination of newly isolated lines were reared along with parents to study the expression of hybrid vigour and their performance was compared with hybrids of popular bivoltine races.

RESULTS

The mean rearing performance of the isolated lines and their hybrids in different seasons is given in the Tables I & II. The commercially important traits in the isolated lines have shown insignificant differences between F9 to F10 generation. The lines spinning compact peanut shaped cocoons with medium grains was isolated from the Thailand hybrid and is called as NTC-M. The other line spinning oval cocoons with medium grains was isolated from the Chinese hybrid and called as CTM. The larval duration of the NTC-M and CTM is 24 hours less (table I) compared to popular bivoltine races. The yield / 10 000 larvae is 2 to 3 kg more in NTC-M and 1 to 2 kg in CTM compared to popular races. The survival in both the isolated lines is 10 to 15 % more. The single cocoon weight in the isolated lines is almost on par with the popular races. Whereas, the shell weight and CSR % is more than the popular races. The pupation rate is more than 15 % in the isolated lines compared to popular races (Table I & II).

The rearing performance of the hybrids NTC-M $\times$ CTM and their reciprocal is studied in different seasons along with the popular bivoltine hybrids. The cocoon yield / 10 000 larvae is more than 2 kg by weight and 15 % by number compared to popular hybrids. The cocoon shell ratio is 1 to 2 % more in the new hybrids depending on the season (Table II).

The post cocoon parameters of new hybrids were also studied. The reelability is 80 to 85 % with the filament length is of 800-900 meters in the new hybrids. The denier is 2.2 to 2.4 with neatness scoring 90 to 95 points which is 5 to 10 points more than the popular races.

DISCUSSION

Sericulture in tropics is associated with rearing of polyvoltine silkworms which are well adopted for high temperature and poor quality of mulberry leaf (Anonymous, 1975). The bivoltines of temperate countries were introduced to tropics either to rear as bivoltine hybrid or to cross with polyvoltines to increase the silk content and quality. At present the commercial bivoltine hybrids in India exhibit poor survival and low silk content compared to bivoltine races of China and Japan (Datta, 1992). This has emphasised the need for the bivoltine races with a good survival and silk content. The ultimate expression of the genetic potential of the race will be the result of interaction with agroclimatic conditions and leaf quality. As the sericulture industry in India is expanding from traditional area to new areas showing different agroclimatic conditions, the need for regional and seasonal races is very much felt. In sericulturally advanced countries like Japan and China, government has authorised different bivoltine races of silkworms for different seasons and regions (Nirmalkumar and Yamamoto, 1994). In the present study, the exotic genetic material which is in commercial usage is selected. The inbreeding technique (Anonymous, 1993) was adopted to isolate

the lines. Tsuchiya and Kurashima (1959) and Gamo and Ichiba (1971) have established the correlations among different traits. They have shown that the cocoon yield is positively correlated with the cocoon weight and survival. The cocoon weight is positively correlated with the filament length. Whereas, filament thickness is negatively correlated with filament length. The larval survival and pupation is negatively correlated with improvement in quantitative traits. The isolated bivoltine lines reported in the present study have also showed similar correlations. However, the survival has not suffered with higher shell content compared to control. Thus, the identified lines are superior to the popular races. Therefore, in the present study, emphasis is given to select line with good survival and pupation with moderate improvement in CSR %. The cocoon weight and CSR % in the NTC-M and CTM is ranging from 1.2 to 1.5 g, and 20 to 21 % respectively against the popular bivoltine races in which the cocoon weight is 1.4 to 1.5 g and CSR is 18 to 20 %.

Table 1. Mean values of Economic traits of new bivoltine races NTC-M, CTM and control races NB4D2 & KA.

Tableau 1. Valeurs moyennes des caractéristiques économiques des nouvelles races bivoltines NTC-M, CTM et des races témoins NB4D2 & KA.

Seasons	Race	Fec.	Hat (%)	LD	Yield / 10 000 larvae			Pupation	
					No.	Wt.	SCW (g)	CSR (%)	Rate (%)
					Rendement / 10 000 larves				
Saisons	Race	Fec.	Ecllosion (%)	LD	Nbre.	Pds.	SCW (g)	CSR (%)	Taux de pupaison (%)
Summer / Eté	NTC-M	519	94.13	25:00	8716	9.57	1.17	21.96	93.38*
Rainy / Pluvieux	NTC-M	514	95.95*	25:12	8607	13.42*	1.58*	21.11	88.00
Winter / Hiver	NTC-M	619*	91.52	27:06*	8680	12.35*	1.46*	21.69	90.28*
Summer / Eté	NB4D2	480	88.60	25:12	7072*	8.32	1.24	19.17	62.86
Rainy / Pluvieux	NB4D2	502	90.30	26:06	8540	11.16*	1.57*	19.35	71.94*
Winter / Hiver	NB4D2	587*	96.00*	28:06*	6239*	9.35	1.50*	18.47	68.68
Summer / Eté	CTM	491	92.80	24:12	8257	9.69	1.21	19.80	88.77
Rainy / Pluvieux	CTM	479	91.91	24:12	8289	12.42*	1.34*	20.19*	90.25*
Winter / Hiver	CTM	523*	90.41	27:06*	8700	11.03*	1.34*	21.56*	92.00*
Summer / Eté	KA	420	88.4	25:12	7125*	9.56	1.42	19.02	63.08
Rainy / Pluvieux	KA	426	91.10	24:12	7407	9.87	1.41	19.85	70.17
Winter / Hiver	KA	446	90.30	28:06*	7285	10.66*	1.46*	20.54*	66.22

LD : Larval duration / *Durée larvaire (jours)*

SCW : Single cocoon weight / *Poids d'un cocon (g)*

CSR : Cocoon silk ratio / *Richesse soyeuse (%)*

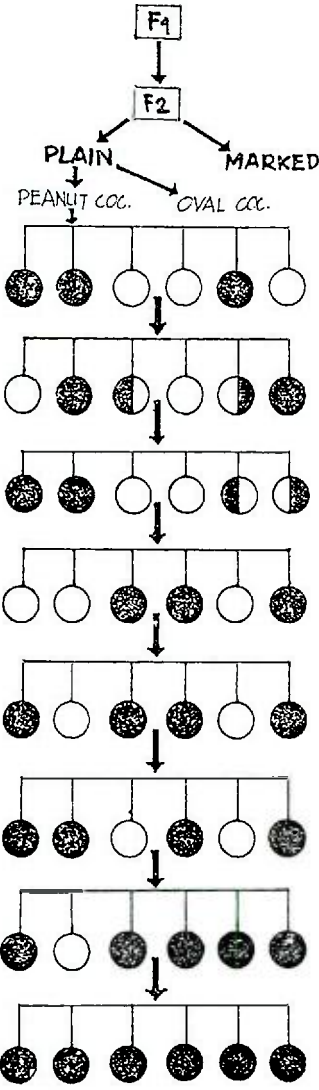


Fig. 1. Breeding plan - NTC - M (peanut).

Fig. 1. Plan de breeding - NTC - M (cintré).

F₃
F₄
F₅
F₆
F₇
F₈
F₉
F₁₀

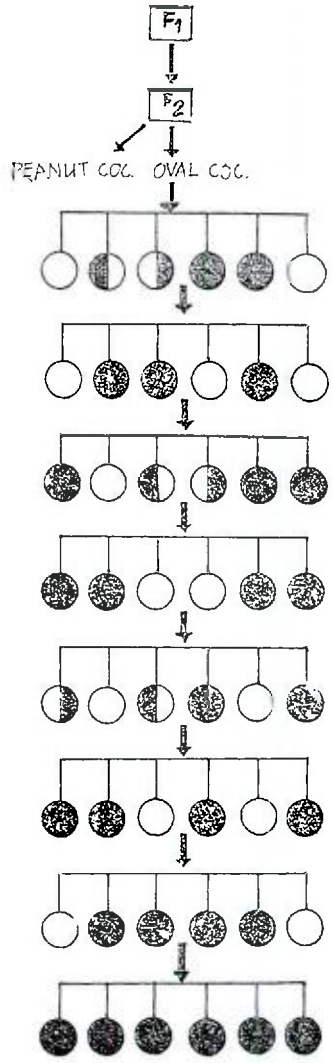


Fig. 2. Breeding plan - CTM (oval).

Fig. 2. Plan de breeding - CTM (oval).

Table II. Mean values (Average of 2 yrs) of economic traits of the new Bivoltine hybrids.

Tableau II. Valeurs moyennes (Moyenne sur 2 ans) des caractéristiques économiques des nouveaux hybrides bivoltins.

Seasons	Hybrids	Fec.	Hat.(%)	LD	Yield / 10 000 larvae				Pupation Rate (%)	V Age
					No.	Wt.	SCW (g)	CSR (%)		
Saisons	Hybrides	Fec.	Ecl.(%)	LD	Rendement / 10 000 larves				Pupaison (%)	V Age
					Nbr	Pds.	SCW (g)	CSR (%)		
Summer / Eté	NTC-M	461	87.24	24:12	9448*	12.65*	1.44*	21.66*	86.64	7:00
Rainy / Pluies	X	529*	92.50*	26:00	9148*	13.42*	1.48*	20.87	91.40*	8:04*
Winter / Hiver	CTM	628*	92.15*	27:12*	9493*	13.08*	1.56*	20.89	86.80	8:20*
Summer / Eté	NB4D2	460	87.80	26:00	5733	7.10	1.25	20.70	58.28	7:18
Rainy / Pluies	X	535*	90.70*	26:10	6872	8.80	1.30	20.54	64.63	8:04*
Winter / Hiver	KA	550*	93.00*	27:12*	7433	10.33*	1.39*	20.11	66.78	8:20*
Summer / Eté	CTM	476	88.84	24:12	8711	11.67*	1.44*	20.58	86.72	7:00
Rainy / Pluies	X	464	90.29*	26:06	8970*	10.80*	1.49*	20.86	91.17*	8:04*
Winter / Hiver	NTC-M	524*	90.14*	27:12*	8480	13.58*	1.59*	20.71	88.22	8:20*
Summer / Eté	KA	422	87.80	26:10	7150	9.09	1.26	19.04	71.13	7:18
Rainy / Pluies	X	436	91.10*	26:16	7300	9.64	1.32	19.69	65.66	8:04*
Winter / Hiver	NB4D2	440	90.80*	28:00*	7550	10.64*	1.33*	18.94	55.12	8:20*

LD : Larval duration / Durée larvaire (jours). * $P < 0.05$

SCW : Single cocoon weight / Poids d'un cocon (g)

CSR : Cocoon silk ratio / Richesse soyeuse (%)

The newly evolved lines were subjected for hybridization considering the distant origin and the performance have shown improvement in the traits (Table II). Limited number of rearings and feed back from the farmers has also shown high yield (55 kg) and cocoon price (Rs. 160) and low renditta (6.5 - 7 kg). Further studies on the post cocoon parameters have shown improvement in reelability, filament length and neatness over the existing popular races. This clearly suggests the economic feasibility of these races in the field.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors sincerely acknowledge Sri.U. Lakshminarasimhaiah and others who have rendered services to complete this work and also to the progressive farmers who reared these races.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1975) Text book of tropical sericulture, Japan Overseas Co-operative Volunteers. Tokyo, Japan. pp 9-593.
- ANONYMOUS (1993) Principles and techniques of silkworm breeding, Economic and Social Commission for Asia and the Pacific, New York. pp 1-111.
- DATTA R.K. (1984) Silk Industry (special) : Problems and Prospects, Indian text J. 105 : 79-86.
- DATTA R.K. (1992) Present status and future perspectives in silkworm breeding : All India conference on cytology and genetics, Bangalore.
- FASTER M (1969) A guide to genetic standards for laboratory animals, Ed. Nat. Acad. of Sci., Washington D.C. pp 1-35.
- GAMO T. and ICHIBA S. (1971) Selection experiments on the fibroin hydrolysing ratio in silkworm cocoons, its effects on the environmental characters, Japan J. Breed., 21(2), 87-92.
- GAMO T. and OHTSUKA Y. (1980) Phylogenetic studies on the racial differences of the silkworm, *Bombyx mori*, on the basis of Polymorphic genes in haemolymph proteins. Bull. Seric. Expt. Sta., 28 15-20.
- GAMO T. (1983) Biochemical genetics and its application to the breeds of the silkworm, JARQ, 16 264-272.
- HIROBE T. (1968) Evolution, differentiation and breeding of the silkworm. In silk road - past and present. Genetics in Asian countries, 12th Int. Cong. Genetics, Tokyo. 25-36.
- JOLLY M.S. (1983) Silkworm breeding in India. In silkworm genetics and breeding. Nat. Sem. Silk Res. Dev., Bangalore, India. 1-9.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing CSR & TI. Bull. 2.
- NIRMALKUMAR S. and YAMAMOTO T. (1994) Silkworm breeding concepts in Japan. Indian Silk (Aug.), 9-15.
- SHETTY M.V.G. and REDDY S.G. (1993) Isolation of new bivoltine line MU 756 by induction of genetic variability in the silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 33(1), 15-20.
- TSUCHIYA S. and KURASHIMA H. (1959) Studies on the heritability of measurable characters in *Bombyx mori* (II). Heritability in the hybrids of two different strains. J. Sericult. Sci., Japan. 27(4) 253-256.
- YOKOYAMA T. (1979) Silkworm selection and hybridization. In genetics in relation to insect management, worked papers, Rockefeller foundation, 71-83.

OBTENTION DE LIGNEES DE VERS A SOIE BIVOLTINS AVEC UN TAUX DE SURVIE ET UNE RICHESSE SOYEUSE AMELIORES POUR LES ZONES TROPICALES AU KARNATAKA

B.M. SEKHARAPPA, P.G. RADHAKRISHNA, K.S. KESHAVAREDDY & S.B. DANDIN

K.S.S.R. & D.I. Thalaghattapura, Bangalore - 560 062, Inde.

Un état tropical comme le Karnataka, qui produit le plus de soie en Inde a sérieusement besoin de variétés de vers à soie bivoltines avec un meilleur taux de survie et une teneur en soie plus élevée que les bivoltins commerciaux actuels. Des génotypes de vers à soie d'origines géographiques variées ont été utilisés comme matériel source de cette étude. L'inbreeding et des méthodes de ségrégation ont été employés pour isoler les lignées de cette étude. Une lignée à cocon cintré, en l'occurrence NTC-M d'un hybride de Thaïlande et une lignée à cocon oval d'un hybride chinois ont été identifiées avec une teneur en soie de 20 à 21 %. Les hybrides de ces lignées ont montré des performances encourageantes à la fois en laboratoire et sur le terrain grâce à un rendement meilleur (2 à 3 kg en plus), un prix de cocon plus élevé (160 Rs.) et un rendement à la bassine de 6,5 à 7 kg avec une amélioration significative des caractères de la fibre (>92 points). Cet article présente le plan de breeding et la performance des hybrides et des lignées pures au cours des saisons.

INTRODUCTION

L'élevage du ver à soie est une industrie agricole vieille de plus de 4000 ans. L'interaction de l'environnement avec les génotypes de vers à soie a donné de nombreuses variétés aux caractères spécifiques comme les monovoltins, les bivoltins (dans des conditions tempérées et subtropicales) et les polyvoltins (dans des conditions tropicales) (Hirobe, 1968). Ces variétés montrent des différences génétiques, physiologiques, éthologiques, morphologiques et quantitatives (Yokoyama, 1979 ; Gamo & Ohtsuka, 1980 ; Gamo, 1983). Les monovoltins et les bivoltins sont connus pour leurs meilleurs caractères quantitatifs et leur soie de qualité et sont sensibles au stress environnemental et alimentaire. Les polyvoltins sont tolérants à ces stress et ont un rendement faible et une mauvaise qualité de soie (Anonyme, 1985). Beaucoup d'efforts ont été faits depuis de nombreuses années pour améliorer les traits convenant aux conditions tropicales, ce qui a entraîné de nombreuses lignées nouvelles de vers à soie (Jolly, 1983 ; Datta, 1984). L'inbreeding continu et l'interaction avec l'environnement ont entraîné une dépression consanguine (Faster, 1969). Les bivoltins sont utilisés pour la préparation de lignées croisées avec les polyvoltins pour obtenir une meilleure valeur médiane des parents. Cependant, des efforts continus sont fait pour élaborer des bivoltins supérieurs convenant aux conditions tropicales. A la lumière de ces faits, nous nous sommes efforcés dans cette étude d'élaborer des races (cintrées et ovales) ayant des caractères supérieurs pour l'exploitation commerciale dans des conditions tropicales.

MATERIELS ET METHODES

Deux programmes de breeding ont été démarrés simultanément en utilisant des hybrides F1 provenant de Thaïlande et de Chine. Les hybrides F1 et F2 ont été élevés en masse avec les hybrides bivoltins populaires (KA × NB4D2 & NB4D2 × KA) en suivant la procédure standard d'élevage (Krishnaswami, 1978). A partir de la génération F2, les hybrides thaïlandais se sont divisés en larves marquées et uniformes. Les larves uniformes et marquées ont été isolées et élevées séparément. Les lots isolés ont filé à la fois des cocons cintrés et ovales. L'hybride chinois ne montre pas de ségrégation pour les marquages larvaires et file à la fois des cocons cintrés et ovales. Les cocons cintrés et ovales ont été maintenus séparément. A partir de la génération F3, la méthode de breeding cellulaire a été suivie avec six répétitions jusqu'à l'arrivée de la génération F10. Une sélection stricte des paramètres a été poursuivie pendant les différentes étapes de développement pour isoler les lignées. Des croisements intra et inter-cellules ont été réalisés pour obtenir des traits maximaux. Une lignée, filant des cocons cintrés à partir d'un hybride thaïlandais et une lignée filant des cocons ovales à partir d'un hybride chinois montrant de meilleures performances pour tous les traits ont été sélectionnées pour être évaluées ultérieurement. Le mode de sélection et d'isolement est présenté dans le plan de breeding (fig. 1 et 2). Les hybrides de lignées nouvellement isolées ont été élevés avec les parents pour étudier l'expression de la vigueur hybride et leurs performances ont été comparées avec les hybrides de races bivoltines populaires.

RESULTATS

La performance d'élevage moyenne des lignées isolées et de leurs hybrides pendant différentes saisons est présentée dans les tableaux I et II. Les traits commercialement importants chez les lignées isolées présentent des différences insignifiantes entre la génération F9 et F10. La lignée filant des cocons cintrés compacts avec des grains moyens a été isolée à partir de l'hybride thaïlandais et est appelée NTC-M. L'autre lignée filant des cocons ovales avec des grains moyens a été isolée à partir de l'hybride chinois et appelée CTM. La durée larvaire de NTC-M et de CTM est inférieure de 24 heures (Tableau I) par rapport aux races bivoltines populaires. Le rendement / 10 000 larves est supérieur de 2 à 3 kg chez NTC-M et de 1 à 2 kg chez CTM par rapport aux races populaires. La survie chez les deux lignées isolées est de 10 à 15 % supérieure. Le poids d'un cocon chez les lignées isolées est presque égal à celui des races populaires. Tandis que le poids de la coque et la richesse soyeuse sont supérieurs à ceux des races populaires. Le taux de nymphose est supérieur de 15 % chez les lignées isolées comparé aux races populaires (Tableau I & II).

La performance d'élevage des hybrides NTC-M × CTM et de leurs répliques a été étudiée pendant différentes saisons avec les hybrides populaires bivoltins. Le rendement en cocons / 10 000 larves est supérieur de 2 kg en poids et de 15 % en nombre par rapport aux hybrides populaires. La richesse soyeuse est supérieure de 1 à 2 % chez les nouveaux hybrides en fonction de la saison (Tableau II).

Les paramètres post-cocon des nouveaux hybrides ont aussi été étudiés. La dévidabilité est de 80 à 85 %, avec une longueur de filament de 800 à 900 mètres chez les nouveaux hybrides. Le denier est de 2,2 à 2,4 avec une netteté de 90 à 95 points, ce qui représente 5 à 10 points de plus que les races populaires.

DISCUSSION

La sériciculture dans les zones intertropicales est associée à l'élevage de vers à soie polyvoltins qui s'adaptent bien à une température élevée et à une mauvaise qualité de feuille de mûrier (Anonyme, 1975). Les bivoltins des pays tempérés ont été introduits sous les tropiques soit pour les élever comme des hybrides bivoltins soit pour les croiser avec des polyvoltins pour améliorer la richesse soyeuse et leur qualité. Actuellement, les hybrides bivoltins commerciaux en Inde ont un mauvais taux de survie

et une faible teneur en soie par rapport aux races bivoltines de Chine et du Japon (Datta, 1992). Cela a accru le besoin en races bivoltines avec de bons taux de survie et de richesse soyeuse. L'expression ultime du potentiel génétique d'une race est le résultat de l'interaction avec les conditions agroclimatiques et avec la qualité de la feuille. Comme l'industrie séricicole en Inde s'étend de zones traditionnelles à de nouvelles zones présentant des conditions agroclimatiques différentes, il existe un besoin sérieux en races régionales et saisonnières. Dans les pays où la sériciculture est développée comme le Japon et la Chine, le gouvernement a autorisé différentes races bivoltines de vers à soie pour des saisons et des régions différentes (Nirmalkumar et Yamamoto, 1994). Dans l'étude actuelle, le matériel génétique exotique d'usage commercial a été sélectionné. La technique d'inbreeding (Anonyme, 1993) a été adoptée pour isoler les lignées. Tsuchiya et Kurashima (1959) et Gamo et Ichiba (1971) ont établi des corrélations entre différents traits. Ils ont montré que le rendement en cocons est positivement corrélé avec le poids du cocon et la survie. Le poids du cocon est corrélé positivement avec la longueur du filament. Tandis que le titre du filament est corrélé négativement avec la longueur du filament. La survie larvaire et la nymphose sont négativement corrélées avec l'amélioration des traits quantitatifs. Les lignées bivoltines signalées dans l'étude actuelle montrent aussi des corrélations similaires. Cependant, la survie n'a pas affecté la teneur en soie plus élevée par rapport au témoin. Ainsi, les lignées identifiées sont supérieures aux races populaires. Dans l'étude actuelle, l'accent a donc été mis sur la sélection de lignées avec de bonnes survie et nymphose et une amélioration modérée de la richesse soyeuse. Le poids du cocon et la richesse soyeuse chez NTC-M et CTM sont compris entre 1,2 et 1,5 g et 20 et 21 % respectivement par opposition aux races bivoltines populaires pour lesquelles le poids du cocon est de 1,4 à 1,5 g et la richesse soyeuse de 18 à 20 %.

Les lignées nouvellement élaborées ont été soumises à l'hybridation en tenant compte de l'origine distante et de la performance et présentent des traits améliorés (Tableau II). Un nombre limité d'élevages et les informations en retour des éleveurs montrent aussi un rendement (55 kg) et un prix de cocon (160 Rs.) élevés et un rendement à la bassine élevé (6,5 - 7 kg). Des études supplémentaires sur les paramètres post-cocon montrent une amélioration de la dévidabilité, de la longueur du filament et de la netteté par rapport aux races populaires existantes. Cela prouve clairement la faisabilité économique de ces races sur le terrain.

IMPACT OF AN ARTIFICIAL DIET ON LARVAL DEVELOPMENT AND COCOON CHARACTERS OF MULBERRY SILKWORM *BOMBYX MORI* L. (BIVOLTINE PURE RACES)

B. HARESH KUMAR & S. S. THAKUR

Sericulture Laboratory, Department of Zoology, Osmania University, Hyderabad - 500 007, A. P. India.

*An investigation was carried out on the impact of Artificial diet on the larval development and cocoon characters of mulberry silkworm, **Bombyx mori** by using Indian Bivoltine pure races viz., NB4D2, NB7, NB18 and KA. The Chawki (1 - 3 instars) silkworm larvae reared on Artificial diet, synthesized and standardised at this laboratory. The chawki stages of Artificial diet larvae (experimental) were shifted to mulberry leaves after recovery from 3rd moult and reared on mulberry leaves up to 5th instar. Parallel control worms also maintained, feeding all stages on mulberry leaves. The detailed data have been analyzed and discussed in the present communication.*

Keywords: Artificial diet, bivoltine race, *Bombyx mori*, silkworm, chawki rearing.

INTRODUCTION

During the last few decades, several attempts have been made to formulate artificial diet for silkworms but it was restricted to some advanced countries like Japan. First attempt was made by Ito and his co-workers on *Bombyx mori* in 1950's. Later attempts are those of Hamamura (1970), Satoshi Takeda (1985), Kunio Takamiya *et al.*, (1981), Fujiyoshi Matsubara *et al.*, (1987), Youshikata Iwanari and Yosie Ohno (1989) and Tzenov and Petkov (1991). Recent progress on artificial diet in Japan is development of a low - cost artificial diet for silkworms and their breeding suitable for mass rearing farms. (Mano *et al.*, 1991).

Tropical country like India, which is traditionally sericultural and occupies second place in the world in producing mulberry silk. India has to develop its own artificial diet for Indian races of *Bombyx mori*. Necessity of artificial diet for Indian conditions gives several reasons, some of them are: in India, 50% of total mulberry acreage is under rainfed conditions and where rain often fails or is delayed. In such circumstances, production of quality leaf will be hampered which in turn affects the production and quality of silk. Rearing of silkworms with artificial diet can solve this problem (Tomy Phillips, 1990 and Duan Jia Lang, 1992). Such effort has been done in India since few years. Our laboratory is one, which has been developing artificial diet for Indian bivoltine races of *Bombyx mori*.

The present study deals with a comparative study on the growth and development of larvae on artificial diet and cocoon characters of mulberry silkworm (*Bombyx mori*) of Indian bivoltine pure races, namely, NB4D2, NB18, NB7 and KA.

MATERIALS AND METHODS

Egg layings were supplied by N. S. S. P., Bangalore. Rearing of the silkworms carried out in environmental chambers (BOD Incubators) under controlled conditions of temperature $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humidity $70 - 85\% \pm 5\%$ and photoperiod 16 L: 8 D. In case of artificial diet the temperature was usually maintained more by 1°C than for those reared on mulberry leaves. Feeding was given daily 5 times for controls and once or twice in each instar depending on the moisture content in the diet. For artificial diet worms i.e. parallel controls were always maintained for each individual race and rearing techniques were followed as specified in FAO manuals on Sericulture.

Artificial diet contains the following ingredients in different proportions:

Mulberry leaf powder	40%
Soy bean powder	20%
Cellulose	11.5%
Sugar	4%
Vitamin mixture	0.4%
Inorganic salt mixture	4%
Antibiotic	0.015%
Antiseptic	0.6 ml per 2.5 l water
Phytosterol	0.3%

Agar agar 7.5% as a binding agent with distilled water in required quantity.

All these ingredients are thoroughly mixed with distilled water and auto - claved.

Freshly hatched 10 000 (10 DFLS) first instar larvae were brushed on artificial diet and maintained as experimental group and 10 000 (10 DFLS) on mulberry leaves as control group. Experimental group larvae were shifted on mulberry leaves after third moult and maintained as Experimental group only. The yield of cocoons per 10 000 mentioned in Table III denotes the significance of rearing and ERR% as survival rate.

Mulberry variety used in this experiment was M5.

After harvesting of cocoons, cocoons evaluated in our laboratory, except single cocoon reeling which was done at Government Silk Reeling Centre, Vikarabad (A. P.).

This work carried out as a part of the Development of Synthetic Diet for Bivoltine races of *Bombyx mori* during rainy season of 1991.

RESULTS AND DISCUSSIONS

1. Larval duration:

Eating period:

In all cases eating period increased instarwise except in second instar, in which case there is less period than first instar. Among control groups total eating period was between 21 to 23 days. While in experimental group NB18 had 23 days and 20 hours. High eating period was in the control group NB4D2 i.e., 22 days and 17 hours, while among experimental group KA i.e., 24 days and 20 hours.

Moulting period:

In all control groups, the period of moulting was almost near 26 ± 2 hrs. The minimum was 24 hours in all instars, the maximum was 28 hours in 3rd instar of NB18 and KA. While in experimental groups the moulting period was between 28 hours to 40 hours. The minimum was in 2nd and 4th instars of NB4D2, 1st, 2nd and 4th instars of NB7 and 4th instar of NB18 races. The maximum was in first instar of NB18.

Table I. Larval period in each instar (hours).

Tableau I. Durée de la période larvaire pour chaque âge (heures).

Race											Total eating period (days : hrs)	Total moulting period (d: hrs)	Total rearing period (d: hrs)	Difference of period between controls & Expt(d.:h.)
	I		II		III		IV		V		Phase totale de nourrissage (jours : hrs)	Phase totale de mue (jours:hrs)	Phase totale d'élevage (j. :hrs)	Différence entre témoins & exptaux (j. :hrs)
	E	M	E	M	E	M	E	M	E					
NB4D2 (C)	80	24	60	24	89	24	104	27	212		22 : 17	4 : 3	26 : 20	
NB4D2 (E)	96	32	64	28	96	30	120	28	215		24 : 16	4 : 21	29 : 13	2 : 21
NB7 (C)	78	24	64	24	79	27	96	24	200		21 : 13	4 : 3	25 : 16	
NB7 (E)	88	28	72	28	96	30	108	28	212		24 : 00	4 : 18	28 : 18	3 : 02
NB18 (C)	76	24	62	24	76	28	114	28	196		21 : 20	4 : 4	26 : 00	
NB18 (E)	84	40	68	36	80	38	140	28	200		23 : 20	5 : 22	29 : 18	3 : 18
KA (C)	84	24	70	26	88	28	116	24	186		22 : 16	4 : 6	26 : 22	
KA (E)	92	32	76	30	96	38	128	30	204		24 : 20	5 : 10	30 : 6	3 : 08

E : Eating / *Nourrissage*M : Moulting / *Mue*

Total moulting period was ranged between 4 days 3 hours to 4 days 6 hours among controls, while in experimentals 4 days 18 hours to 5 days 22 hours.

Total duration :

Among controls total larval duration was less i.e., 25 days 16 hours in NB7, while high in KA i.e., 28 days 18 hours, high in KA i.e., 30 days 6 hours.

As indicated in Table I, data clearly shows that there was little difference in larval duration between controls and experimentals, this ranges from 2 days 21 hours to 3 days 18 hours. The best performance of development observed in NB4D2 race, in which difference between controls and experimentals was 2 days 21 hours only, whereas NB18 showed high difference that is 3 days 18 hours.

2. Larval weight:

As indicated in Table II, 10 larvae weight at the end of each instar i.e., before going to moult was observed. In all races, at the end of 1st instar, weight was 0.040 gm to 0.044 gm, except in NB4D2 race, in which the larvae weight was higher than others. This indicates that, food consumption and weight gain was excellent in NB4D2 race. In all races the difference between controls and experimentals was 0.001 gm. to 0.004 gm. This is very negligible and growth on diet in 1st instar was very excellent. Diet utilization is almost equal to controls, this was observed in NB7 race. In second and third instar there was also little difference between controls and experimentals i.e., not more than 0.030 gm, except 3rd instar of NB7 race, which was more than 0.1 gm. Perfect larvae growth was considered at the end of 5th instar i.e., before spinning. This was best in KA experimental group. Ironically, in NB4D2, this is very less in which case the first instar larvae weight was much greater than others.

Table II. Weight of 10 larvae at end of each instar (g).*Tableau II. Poids de 10 larves à la fin de chaque âge (g).*

Race	I	II	III	IV	V
NB4D2(C)	0.064	0.286	1.689	9.932	32.432
NB4D2 (E)	0.062	0.267	1.670	9.886	32.628
NB7 (C)	0.044	0.303	1.750	8.538	34.728
NB7 (E)	0.044	0.290	1.614	8.475	34.720
NB18 (C)	0.044	0.306	1.783	8.952	35.623
NB18 (E)	0.040	0.278	1.724	8.862	35.920
KA (C)	0.041	0.299	1.604	8.784	35.072
KA (E)	0.040	0.276	1.584	8.681	36.095

3. Cocoon characters:

Observations as indicated in Table III are:

a. Yield per 10 000 worms brushed (calculated weight in kgs.) was high in NB18 race i.e., 18.673 kg. and 18.320 kg. of controls and experimentals respectively. Though NB4D2 race gave much less quantity of cocoons, experimentals weight was higher than controls.

Table III. Cocoon characters.

Tableau III. Caractéristiques du cocon.

Race	Yield per 10 000 brushed	ERR in %	Single cocoon weight in grams	Shell weight	Shell ratio percentage	Length of filament (m)	Length of non breakable length (m)	Size of filament (denier)
	<i>Rendement pour 10 000 vers levés</i>	<i>Taux d'élevage effectif</i>	<i>Poids unitaire des cocons en grammes</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse</i>	<i>Longueur de la bave (m)</i>	<i>Longueur sans rupture (m)</i>	<i>Titre de la bave (denier)</i>
NB4D2 (C)	10.463	97	1.048	0.204	19.46	920	802	2.26
NB4D2 (E)	12.113	97	1.207	0.226	18.72	940	886	1.60
NB7 (C)	16.734	94	1.673	0.376	22.47	921	657	1.50
NB7 (E)	16.940	95	1.710	0.373	21.81	929	686	1.60
NB18 (C)	18.673	98	1.869	0.378	20.28	903	734	1.92
NB18 (E)	18.320	98	1.833	0.383	20.89	961	765	2.10
KA (C)	13.469	90	1.350	0.341	25.25	975	645	2.06
KA (E)	13.826	91	1.386	0.345	24.89	1.010	686	2.76

C: Controls / *Témoins*E: Experimentals / *Sujets expérimentaux*

ERR: Effective Rate Rearing is calculated after harvesting of crop of cocoons over the number of larvae brushed. Denotes the survival or missing larval percentage. / *Le taux d'élevage effectif est calculé après la récolte des cocons sur le nombre de larves levées. C'est un indicateur du pourcentage de survie ou de larves manquantes.*

b. Single cocoon weight was high in NB18 race, between controls and experimentals difference was not significant. Naturally NB4D2 race got very less cocoon weight as their mature larval weight was very less.

c. Commercially shell weight and shell ratio percentage are very important. Shell weights of artificial diet groups were very near or more than controls.

d. Shell ratio percentage was more in KA and less in NB4D2 races. In NB18 artificial diet groups were showed high shell ratio percentage than controls. In almost all races, difference of shell ratio% between experimentals and controls was not significant.

e. Length of the filament: this was done on an appropriate length and was calculated by reeling 10 single cocoons and taking mean length. Long filament length was reeled out from KA cocoons

reared on artificial diet, that was 1 010 metres. In all groups, length of filament ranges from 900 to 1000 metres and in all cases artificial diet experimental groups gave more length of filament than controls.

f. Non - breakable filament length (calculated) also gave long length of filament in both controls and experimentals.

g. Size of the filament that is thickness of filament, measured in Denier, was varying with races. Difference between experimentals and controls was very significant.

From the above results, it was clearly indicated that the growth and development of artificial diet fed silkworms was better and very near to that of controls. Recovery after shift to mulberry leaves was also very fast. Both quality wise and quantity wise the cocoons were better with artificial diet and almost equal to controls, some times superior than controls.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to the funding agency, the Central Silk Board, Bangalore, for their financial help under National Sericulture Project.

REFERENCES

- DUAN JIA LANG 1992. Suggestions and Recommendations on Indian Silk, September 25 - 28.
- HAMAMURA Y. 1970. The substances that control the feeding behaviour and the growth of the silkworm *Bombyx mori* L. Control of insect behaviour by natural products (Eds by David L. Wood, Robert, M. Silverstein and Minoru Nakajima). Academic Press. New York. London.
- FUJIYOSHI MATSUBARA, SANG QUIAN, HIDEAKI SUGIMOI, MASAHAISA ISHIKO, MOTOYUKI SUMIDA and TSUGUO MATSUMOTO 1987. Utilization efficiency of an artificial diet on the silkworms fed twice during their larval stages. J. Seric. Sci. Japan, 57 (1) : 83 - 84.
- KUNIO TAKAMIA, YOUKICHI KOBARI and AKIO SHIBUKAWA 1981. Rearing of the silkworm races of high productive cocoon shell on artificial diet. J. Sericulture. Sci. Japan, 50 (3) : 215 - 216.
- SATOSHI TAKEDA 1985. Effects of egg incubation and rearing conditions on the development of 3rd instar larvae of the silkworm *Bombyx mori* reared on artificial diet. J. Seric. Sci. Japan, 54 (6) : 482 - 487.
- TOMY PHILLIPS 1990. And now, an artificial diet for silkworms. Indian silk, January 39 - 41.
- TZENOV P. and PETKOV N. 1991. Accomodation of F1 silkworm pupae (*Bombyx mori*) to artificial food Gent. Sel., 24 (3) : 207 - 210.
- YOUSHIKATA IWANARI & YOSIE OHNO 1989. Rearing experiments of silkworms on the artificial diets composed mainly of the mulberry leaf powder harvested on the late autumnal and thereafter season. Journal of Seric. Sci. Japan, 38 (4) 301 - 306.

IMPACT D'UNE ALIMENTATION ARTIFICIELLE SUR LE DEVELOPPEMENT LARVAIRE ET LES CARACTERISTIQUES DU COCON DU VER A SOIE DU MURIER *BOMBYX MORI* L. (RACES PURES BIVOLTINES)

B. HARESH KUMAR & S. S. THAKUR

Sericulture Laboratory, Department of Zoology, Osmania University,
Hyderabad - 500 007, A. P. Inde.

*Une étude approfondie a été menée afin d'étudier l'impact d'une alimentation artificielle sur le développement larvaire et les caractéristiques du cocon du ver à soie du mûrier **Bombyx mori**, en utilisant des races pures bivoltines indiennes à savoir, NB4D2, NB7, NB18 et KA. Le Chawki (nom donné à la larve du ver à soie entre le 1^{er} et le 3^{ème} âge) a été élevé avec une alimentation artificielle synthétisée et standardisée dans ce laboratoire. La larve Chawki est passée d'une alimentation artificielle (expérimentale) aux feuilles de mûrier, après la fin de la troisième mue et jusqu'au cinquième stade. Une étude témoin sur des vers élevés avec des feuilles de mûrier pendant la durée totale des stades larvaires, a été menée en parallèle. Les données détaillées ont été analysées et discutées dans la communication présente.*

INTRODUCTION

Durant les quelques dernières décennies, plusieurs tentatives ont été faites afin d'établir une formule pour l'alimentation des vers à soie, mais ceci a été réservé à des pays économiquement plus développés comme le Japon. La première tentative sur *Bombyx mori* a été effectuée par Ito et ses collègues dans les années 1950. Les tentatives ultérieures ont été celles de Hamamura (1970), de Satoshi Takeda (1985), de Kunio Takamiya et coll., (1981), de Fujiyoshi Matsubara et coll., (1987), de Youshikata Iwanari et Yosie Ohno (1989) et de Tzenov et Petkov (1991). Au Japon, les progrès récents en matière d'alimentation artificielle des vers à soie et de leur descendance, sont axés sur le développement d'une alimentation artificielle à faible coût de revient, qui conviendrait à des fermes pratiquant l'élevage de masse (Mano et coll., 1991).

L'Inde est un pays tropical, de tradition séréricole et qui occupe la seconde place mondiale de la production de soie de mûrier. L'Inde doit développer sa propre alimentation artificielle pour les races indiennes de *Bombyx mori*. La nécessité d'une alimentation artificielle pour les conditions indiennes est due à plusieurs raisons, dont certaines d'entre elles sont : 50 % de la superficie occupée par les mûriers est exposée à des pluies abondantes ainsi qu'à des endroits où il pleut fréquemment ou encore où la pluie est retardée. Dans de telles circonstances, la production d'une feuille de qualité est gênée, ce qui affecte à son tour la production et la qualité de la soie. L'élevage des vers à soie à partir d'une alimentation artificielle pourrait résoudre ce problème (Tomy Phillipps, 1990 et Duan Jia Lang, 1992). Des efforts à ce propos ont été effectués en Inde depuis quelques années. Notre laboratoire est l'un de ceux qui a développé une alimentation artificielle pour les races bivoltine indiennes de *Bombyx mori*.

L'étude présente est une étude comparative sur la croissance et le développement de la larve nourrie à l'aide d'une alimentation artificielle et sur les caractéristiques du cocon de ver à soie du mûrier (*Bombyx mori*) des races pures indiennes bivoltines, à savoir NB4D2, NB18, NB7 et KA.

MATERIELS ET METHODES

Les pontes ont été fournies par N. S. S. P., Bangalore. L'élevage des vers à soie a été mené en chambres climatiques (incubateurs BOD), sous des conditions contrôlées de température $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, d'humidité : $70 - 85\% \pm 5\%$ et de photopériode : 16 L : 8 O. Pour les vers nourris avec l'alimentation artificielle, la température a été maintenue à 1°C au-dessus de celle des vers nourris avec des feuilles de mûrier. Les vers témoins ont été nourris 5 fois par jour et une ou deux fois pendant chacun des stades, la fréquence étant dépendante de la teneur en humidité de l'alimentation pour les autres. En parallèle aux vers nourris avec l'alimentation artificielle, des vers témoins ont été élevés pour chacune des races et les techniques d'élevage ont été suivies conformément aux manuels de la F. A. O. sur la sériciculture.

L'alimentation artificielle contient les ingrédients suivants dans des proportions différentes :

Poudre de feuilles de mûrier	40 %
Poudre de soja	20 %
Cellulose	11,5 %
Sucre	4 %
Mélange de vitamines	0,4 %
Composé de sel inorganique	4 %
Antibiotique	0,015 %
Antiseptique	0,6 ml par 2,5 l d'eau
Phytostérol	0,3 %

De l'agar agar à 7,5 % dilué dans de l'eau distillée en quantité nécessaire, a été utilisé comme liant.

Tous ces ingrédients ont été soigneusement mélangés à de l'eau distillée et autoclavés. 10 000 larves de premier stade, fraîchement écloses ont été élevées avec l'alimentation artificielle et maintenues comme groupe expérimental et 10 000 ont été nourries avec des feuilles de mûrier et maintenues comme groupe témoin. Le groupe expérimental a été transféré sur feuilles de mûrier après la troisième mue et maintenu seul comme groupe expérimental. Le rendement en cocons par 10 000 dont il est question dans le Tableau III, indique que l'élevage et le taux effectif d'élevage (ERR) sont significatifs pour le taux de survie.

La variété de mûrier utilisée pour cette expérience est M5.

Après la récolte des cocons, les caractéristiques des cocons ont été évaluées dans notre laboratoire, exceptée celle concernant le dévidage des cocons, qui fut effectuée par le Government Silk Reeling Centre, Vikarabad (A. P.).

Ce travail a été effectué dans le cadre du développement des régimes de synthèse pour les races bivoltines de *Bombyx mori*, pendant la saison des pluies de 1991.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Durée de la période larvaire :

Période de nourrissage :

Pour tous les cas, la période de nourrissage augmente en fonction des stades sauf pendant le deuxième stade, pendant lequel la période de nourrissage fut moins importante que celle du premier stade. Chez les groupes témoins, la période totale de nourrissage est comprise entre 21 et 23 jours,

alors que pour le groupe expérimental NB18, elle est de 23 jours et 20 heures. Ce fut le groupe témoin NB4D2 qui eut la période de nourrissage la plus élevée, i.e. 22 jours et 17 heures, alors que parmi le groupe expérimental KA elle fut de 24 jours et 20 heures.

Période de mue :

Chez tous les groupes témoin, la période de mue fut près de 26 ± 2 heures. Le minimum fut de 24 heures pour tous les stades et le maximum fut de 28 heures pour le troisième stade de NB18 et de KA, alors que chez les groupes expérimentaux, elle se situa entre 28 et 40 heures. Elle fut minimum pour les deuxième et quatrième stades de la race NB4D2, pour les premier, deuxième et quatrième stades de la race NB7 et pour le quatrième stade de la race NB18. Elle fut maximum pendant le premier stade de NB18.

La période totale de mue fut comprise entre 4 jours 3 heures et 4 jours 6 heures chez les groupes témoins, alors que chez les groupes expérimentaux, elle fut comprise entre 4 jours 18 heures et 5 jours 22 heures.

Durée totale :

Chez les témoins, la durée totale de la période larvaire était moindre à savoir, 25 jours 16 heures pour NB7, alors qu'elle était plus élevée pour KA i.e., 30 jours 6 heures.

Les données du Tableau I nous indiquent qu'il y a peu de différence entre les groupes témoins et les expérimentaux, en ce qui concerne la durée de la période larvaire : celle-ci est comprise entre 2 jours 21 heures et 3 jours 18 heures. La meilleure performance de développement fut observée chez la race NB4D2, pour laquelle la différence entre les groupes témoins et expérimentaux était de 2 jours 21 heures seulement, alors que pour la race NB18, elle était élevée, c'est à dire 3 jours 18 heures.

2. Poids larvaire :

Comme on peut le constater dans le Tableau II, 10 poids larvaires ont été observés à la fin de chaque stade, c'est à dire juste avant la mue. Pour toutes les races, à la fin du premier stade, le poids se situait entre 0,040 g et 0,044 g, sauf pour la race NB4D2, pour laquelle le poids larvaire était plus élevé que celui des autres. Ceci indique que la consommation de nourriture et le gain de poids étaient excellents pour la race NB4D2. Pour toutes les races, la différence entre les groupes témoins et expérimentaux se situait entre 0,001 g et 0,004 g. Cette différence est négligeable, mais la croissance des vers alimentés artificiellement pendant le premier stade, était excellente. Pour la race NB7, il a été observé que l'utilisation du régime artificiel est pratiquement la même que celle des groupes témoins. Pour les second et troisième stades, la différence entre les groupes témoins et expérimentaux était minime, à savoir pas plus de 0,030 g, sauf pour le troisième stade de la race NB7, pour lequel elle était de plus de 0,1 g. C'est à la fin du cinquième stade, c'est à dire juste avant le filage, que la croissance parfaite de la larve fut observée. Les meilleurs résultats furent observés chez le groupe expérimental KA. Il est intéressant de constater que les résultats de la race NB4D2 furent moins bons, alors que pendant le premier stade le poids de la larve était plus important que celui des autres races.

3. Caractéristiques du cocon :

Les observations indiquées dans le Tableau III sont :

a. Le rendement par 10 000 vers levés (poids exprimé en kg) était élevé pour la race NB18, à savoir 18,673 kg pour les groupes témoins et 18,320 kg pour les groupes expérimentaux. Bien que la race NB4D2 donna une quantité moindre de cocons, le poids des groupes expérimentaux était plus élevé que celui des groupes témoins.

b. Le poids unitaire des cocons était élevé pour la race NB18, avec une différence non significative entre les groupes témoins et expérimentaux. Le poids des cocons de la race NB4D2 était naturellement moins important, étant donné que le poids des larves mûres était moindre.

c. D'un point de vue commercial, le poids de la coque et le pourcentage de richesse soyeuse sont des caractéristiques très importantes. Le poids des coques des groupes élevés avec l'alimentation artificielle était très proche voire plus élevé que celui des groupes témoins.

d. On trouve le pourcentage le plus important de richesse soyeuse chez la race KA et le moins important chez la race NB4D2. Pour la race NB18, les groupes alimentés artificiellement donnèrent un pourcentage de richesse soyeuse plus important que celui des groupes témoins. Chez la plupart des races, la différence de pourcentage de richesse soyeuse entre les groupes expérimentaux et les témoins n'était pas significative.

e. Longueur de la bave : celle-ci fut évaluée à partir d'une longueur et calculée en filant 10 cocons unitaires et en prenant leur longueur moyenne. La longueur de la bave la plus longue, de 1 010 mètres a été obtenue à partir de cocons KA élevés avec l'alimentation artificielle. Pour tous les groupes, la longueur de la bave était comprise entre 900 et 1 000 mètres et dans chaque cas, les vers élevés avec l'alimentation artificielle donnèrent une longueur de bave plus importante que les vers témoins.

f. La longueur (calculée), de la bave sans rupture est aussi importante, à la fois chez les groupes témoins et expérimentaux.

g. Le titre de la bave, c'est à dire son épaisseur, mesuré en Denier, est variable en fonction de la race. Les différences entre les groupes témoins et expérimentaux sont très significatives.

D'après les résultats ci-dessus, il est clair que la croissance et le développement des vers à soie nourris artificiellement sont très proches voire meilleurs que ceux des témoins. Le rétablissement des vers après le passage aux feuilles de mûrier fut aussi très rapide. D'un point de vue quantitatif aussi bien que qualitatif, les résultats des cocons obtenus avec l'alimentation artificielle, furent meilleurs, presque semblables, voire supérieurs à ceux des témoins.

EFFECT OF TEMPERATURE ON LEAF - SILK CONVERSION IN SILKWORM *BOMBYX MORI* L

E. MUNIRAJU, B. M. SEKHARAPPA, R. RAGHURAMAN

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore - 560 062, India.

*Efficiency of conversion of mulberry leaf into silk is one of the important properties of silkworm *Bombyx mori*. L. as this is of commercial value. Conversion efficiency will be influenced by factors like silkworm race, mulberry leaf quality and rearing environment. Among the environmental factors, temperature plays an important role in conversion of leaf into silk. The silkworm, Pure Mysore (PM) a multivoltine and NB4D2 a bivoltine (BV) were reared under constant temperature of 26, 28, 30 and 32° C during young age and different combinations during late age to understand the relevance of temperature on leaf - silk conversion and survival. Low temperature (26° C) throughout the rearing favored higher silk conversion (0.062 mg per mg leaf intake) with better survival (87%) in bivoltine and 32° C during young age and 26° C during late age for multivoltine (94.4% survival). Negative correlation for survival and cocoon yield was observed with increasing temperature up to 32° C and lethal beyond this temperature in case of bivoltine. The paper discusses the findings.*

Keywords : Conversion, silkworm and temperature.

INTRODUCTION

The body temperature of silkworm varies with ambient temperature. The physiological activities, food intake and economic parameters are influenced by body temperature of the silkworms (Anonymous, 1972). The effect of temperature during rearing on survival, growth, cocoon production and silk quality have been studied by many workers (Matsumura and Ishizuka, 1929; Kogure, 1933; Matsumura *et al.*, 1958; Ueda, 1963; Ueda and Harizuka, 1962; Yamamoto and Fuzimaki, 1962; Verma and Atwal, 1967; Sigematsu and Takeshita, 1967; Rapusas and Gabriel, 1976; Muniraju, 1995) and recorded low silk production when reared at high temperature and suggested 24 - 26° C as optimum for good rearing results.

The leaf - silk conversion rate of the silkworm is a comprehensive physiological character and also an important economic index in cocoon production. A larva in general ingests about 20 - 25 g of fresh mulberry leaves of which more than 85% is during fifth instar, when the silk gland grows considerably and silk is synthesised. Conversion of silk is determined by temperature the most important environmental factor. With increase in temperature (20 - 30° C) leaf silk conversion rate decreases (Ueda and Suzuki, 1967; Junliang and Xiaofeng, 1992; Muniraju, 1995). Sigematsu and Takeshita (1967) showed an increase in intake of mulberry leaves during late age with decrease in rearing temperature. Food intake, adaptability to changes in environment varies among different races of silkworms (Periaswamy *et al.*, 1984; Naik and Delvi, 1987).

Earlier studies have invariably evaluated constant temperatures during late age rearing on conversion efficiency. Here an attempt has been made to understand the relevance of constant and combinations of constant temperatures during different instars on leaf - silk conversion using bivoltine and multivoltine races.

MATERIALS AND METHODS

Larvae of NB4D2 a bivoltine and Pure Mysore a multivoltine were exposed to different constant and combination of constant temperatures during young age (from hatching upto completion of third moult) and late age (from the beginning of fourth instar to initiation of spinning of cocoons) feeding period. Leaf intake, survival and leaf - silk conversions were assessed. To maintain constant temperatures and required humidity, thermostatically controlled 'Isolation chambers' (Sekharappa *et al.*, 1995) were used. The worms were fed *ad libitum* throughout the rearing inside the chamber. Standard rearing methods were followed (Krishnaswami, 1978), except for temperature. Treatments selected were as follows.

Treatment	Young age rearing Temperature (° C)	Late age rearing Temperature (° C)
1a	26	26
1b	26	28
1c	26	30
1d	26	32
2a	28	26
2b	28	28
2c	28	30
2d	28	32
3a	30	26
3b	30	28
3c	30	30
3d	30	32
4a	32	26
4b	32	28
4c	32	30
4d	32	32

To assess the effect of temperature during rearing on leaf - silk conversion, total dry leaf intake throughout the larval period (for all the instars) was considered. The leaf silk - conversion was assessed by using the formula :

$$\text{Leaf - silk conversion rate} = \frac{\text{Shell wt. (oven dried)}}{\text{Total food intake (dry wt.)}} \times 100$$

For estimating the leaf fibroin conversion rate, four replications of twenty five shells each for different treatments (T1 to T4) were degummed (using 1% soap and 1% sodium carbonate solution) (Anonymous 1982; Sonwalker 1969; Sidhu and Sonwalker, 1969) and subsequently oven dried at 100° C until realising constant weight. The formulac used for assessing different parameters include:

$$\text{Leaf - Fibroin Conversion rate} = \frac{\text{Fibroin Wt.}}{\text{Total food intake (dry wt.)}} \times 100$$

$$\text{Leaf - sericin Conversion rate} = \frac{\text{Wt. of sericin}}{\text{Total food intake}} \times 100$$

$$\text{Weight of Sericin} = \text{Wt. of Shell} - \text{Wt. of fibroin}$$

$$\text{Scouring loss rate} = \frac{\text{Wt. of sericin}}{\text{Wt. of shell}} \times 100$$

Data generated were statistically analysed (Sundaraj *et al.*, 1972) and are presented.

RESULTS AND DISCUSSION

The effects of temperature during rearing on conversion of mulberry leaf into silk are presented in Table I & II. In Pure Mysore, leaf intake is reduced gradually with increase in constant rearing temperature (Table I). Similar response is also recorded in respect of shell weight. Mulberry intake and conversion into shell are better at 32 - 26° C treatment (0.046 mg shell per mg leaf intake) compared to 26 - 32° C treatment (157 mg silk produced per 3045 mg leaf intake). Maximum leaf intake is recorded for batches raised at the highest constant temperature (32° C). Leaf intake and shell weight was reduced for those reared at low temperature during young age and high during late age. There is marginal variation in leaf - silk and leaf - fibroin conversion rate between treatments.

Perusal of Table II shows that leaf intake in NB4D2 is maximum (6165 mg per larvae) at 26 - 26° C as compared to minimum (3365 mg) at the highest temperature tested (32 - 32° C). In NB4D2 the leaf intake is maximum when reared at 28 - 26° C (6372 mg) and least at 32 - 32° C (3365 mg). Leaf - silk and leaf - fibroin conversion rate decrease with increase in temperature. The value for absolute silk content varies according to leaf intake. The scouring loss (percentage) is generally higher in Pure Mysore over NB4D2, irrespective of treatments. However, there is no clear trend in relation to temperature.

Larval duration:

In both PM and NB4D2, the larval duration is maximum (658 and 553 hours respectively) at the tested lowest constant temperature (26° C). The minimum larval duration of 499 and 451 hours is recorded for PM and NB4D2 respectively when reared at 32° C constant temperature. As has been reported by earlier workers even in the present study, the larval duration is reduced with increase in temperature. However, the response is race dependent. For instance PM reared at 32° C has shown maximum reduction (by 58 hours) in larval duration as compared to rearing at 26° C throughout. Young age worms reared at 26° C when shifted to higher temperature has also resulted in reduced larval duration as compared to rearing at 26° C throughout. Maximum reduction in larval period by 70 hours is recorded for that reared at 26° C during young age and 32° C during late age. In bivoltines, reduction of 102 hours at constant temperature of 32° C is recorded in relation to that reared at 26° C. When worms raised at 26° C during young age are shifted to higher temperature, it has also resulted in reduced larval duration as compared to rearing at 26° C throughout. Thus, there is direct correlation between metabolic response of the poikilotherm to temperature. The results are similar to that of earlier findings of Venugopalapilli and Krishnaswami (1987), Hanumappa (1988) and Bhasker *et al.* (1992).

Table I. Effect of temperatures on leaf - silk conversion.

Tableau I. Effet de la température sur la conversion des feuilles en soie.

Race - PURE MYSORE

Treatment (Temp. ° C) (Y — L)	Food intake (mg / la)	Shell weight (mg)	Fibroin wt. (mg / shell)	Leaf - silk con. rate (%)	Leaf - fib con. rate (%)	Scouring loss (%)
<i>Traitement</i>	<i>Conso. de nourriture (mg / la)</i>	<i>Poids de la coque (mg)</i>	<i>Poids de la fibroïne (mg / coque)</i>	<i>Taux de conv. des feuilles en soie (%)</i>	<i>Taux de conv. des feuilles en fibroïne (%)</i>	<i>Pertes au décreusage (%)</i>
26 - 26	3389	158	108	4.66	3.20	31.42
26 - 28	3304	160	108	4.88	3.29	32.68
26 - 30	3172	150	107	4.95	3.39	31.66
26 - 32	3045	157	103	4.97	3.43	31.10
28 - 26	3408	157	107	4.64	3.15	32.15
28 - 28	3377	153	104	4.55	3.08	32.31
28 - 30	3381	153	103	4.56	3.06	32.89
28 - 32	3232	151	104	4.72	3.26	31.24
30 - 26	3416	164	108	4.82	3.18	34.14
30 - 28	3453	162	112	4.76	3.27	31.22
30 - 30	3332	159	109	4.79	3.28	31.55
30 - 32	3511	157	105	4.50	3.00	33.27
32 - 26	3576	166	110	4.66	3.11	33.42
32 - 28	3519	165	111	4.74	3.17	32.98
32 - 30	3535	158	107	4.46	3.03	32.06
32 - 32	3051	137	91	4.50	3.00	33.47
F Test	HS	HS	HS	HS	HS	HS
CD @ 5%	387.49	12.62	9.79	0.64	0.47	1.83
CD @ 1%	516.79	16.83	13.06	0.85	0.63	2.44

HS: Significant at 1% / Significatif à 1 %.

Values in dry weight / Valeurs en poids sec.

Y = Young age rearing temperature / Température d'élevage chez les larves de premiers âges.

L = Late age rearing temperature / Température d'élevage chez les larves de derniers âges.

Table II. Effect of temperatures on leaf - silk conversion

Tableau II. Effet de la température sur la conversion des feuilles en soie

RACE - NB4D2

Treatment (Temp. ° C) (Y - - L)	Food intake (mg / la)	Shell weight (mg)	Fibroin wt. (mg / shell)	Leaf - silk con. rate (%)	Leaf - fib con. rate (%)	Scouring loss (%)
Traitement (Temp. ° C) (Y - - L)	Conso. de nourriture (mg / la)	Poids de la coque (mg)	Poids de la fibroïne (mg / coque)	Taux de conv. des feuilles en soie (%)	Taux de conv. des feuilles en fibroïne (%)	Pertes au décreusage (%)
26 - 26	6165	379	274	6.23	4.50	27.71
26 - 28	6161	354	250	5.89	4.12	29.62
26 - 30	5031	281	209	5.70	4.25	25.38
26 - 32	4490	275	188	6.22	4.21	31.32
28 - 26	6372	366	261	5.58	4.15	28.72
28 - 28	5557	349	250	6.25	4.52	28.52
28 - 30	4681	307	220	6.18	4.50	28.25
28 - 32	4374	288	207	6.69	4.87	28.11
30 - 26	5958	362	259	6.10	4.36	28.50
30 - 28	5557	324	231	6.05	4.19	28.54
30 - 30	4482	254	183	5.67	4.07	28.17
30 - 32	3724	203	144	5.45	3.87	29.12
32 - 26	5997	348	245	5.84	4.11	29.69
32 - 28	5580	309	222	5.59	4.01	28.28
32 - 30	4270	219	158	5.35	3.54	24.94
32 - 32	3365	—	—	—	—	—
F Test	HS	HS	HS	HS	HS	HS
CD @ 5 %	938.1	38.7	30.10	1.07	0.70	3.88
CD @ 1 %	1251.2	51.6	40.14	1.42	0.93	5.17

HS: Significant at 1% / Significatif à 1 %.

Values in dry weight / Valeurs en poids sec. Y = Young age rearing temperature / Température d'élevage chez les larves de premiers âges. L = Late age rearing temperature / Température d'élevage chez les larves de derniers âges.

Leaf - Silk Conversion :

Conversion of leaf to silk is determined by factors like silkworm race, mulberry leaf quality and rearing environment. Temperature influences the conversion rate of leaf to silk (Ueda *et al.*, 1969; Junliang and Xiaofeng, 1992). The present study has shown that Pure Mysore a tropical race, though influenced by the prevailing temperature has a closer range performance at different temperatures as compared to bivoltine. In PM the leaf intake and shell weight at 26 - 26° C combination are 3389 and

158 mg respectively. This drops to 3045 and 157 mg per larvae at 26 - 32° C combination. In contrast to this, the leaf intake and shell weight for bivoltine at 26 - 26° C are 6165 and 379 mg that drops to 4490 and 275 mg for 26 - 32° C combination. From the data it is very clear that PM a tropical race has greater adaptability to higher temperature with higher metabolic rate and greater energy demand for survival resulting in increased intake but decreased absolute silk output.

At recommended rearing temperature (28 - 26° C), bivoltine has shown better silk conversion, wherein 17.41 g (dry wt.) of leaves are ingested (efficiency of 5.74%). Unlike multivoltine where 21.5 g is required to produce the same amount of shell (efficiency of 4.65%). Earlier studies have also shown that leaf to silk conversion varies with silkworm race and mulberry variety used (Junliang and Xiaofeng, 1992).

Larvae reared at 26° C during young age followed by slightly high temperature (28 - 30° C) during late age have shown better performance compared to constant high temperature (32 - 32° C). This phenomenon can be correlated to the field observations. In tropical countries like India, the temperature recorded, gradually increases during March and reaches a peak during April / May. Layings brushed during cooler months like February have shown better silk production even though relatively higher temperature is recorded during late age. At the same time, the layings reared during hotter months result in poor silk production.

Bivoltine has better leaf - silk conversion rate over multivoltine. The rate of conversion is in the range of 5.5 to 6.7% for bivoltine as compared to 4.5 to 5.0% in multivoltine. Similar trend is also observed in respect of leaf - fibroin conversion rate. The sericin content of both bivoltine and multivoltine is not altered at different studied temperatures.

It is evident from the present study that when the temperature is to go beyond 30° C, during late age, the worms during young age are to be reared at lower temperature of 26° C for better adaptability and productivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors deeply acknowledge the Director, Karnataka State Sericulture Research and Development Institute and others who are directly and indirectly responsible for the completion of this work.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1972) Handbook of Silkworm Rearing. Fuji Pub. Co. Ltd. Tokyo, Japan, pp 105 - 108.
- ANONYMOUS (1982) Handbook of Textile Testing. Pub. by Indian Standards Institute. Monak Bhavan, New Delhi, p 153.
- BHASKAR R. M., RAJASHEKAR R., GOVINDAPPA S., (1992) Effect of temperature on the fertility and gonadal organic composition of silkworm *Bombyx mori* L., National conference on mulberry sericulture, Ab. No. 151.
- HANUMAPPA T. V. (1988) Effect of temperature on food and water utilization in different races of the silkworm *Bombyx mori* L., M. Phil dissertation, Bangalore University, Bangalore, pp 1 - 91.
- JUNLIANG Xu., XIAOFENG Wu. (1992) Research on improvement of efficiency of transforming leaf ingested into silk of the silkworm *Bombyx mori*, International Congress of Entomology, Beijing, China, Ab. No. 169 - 003, 623b.
- KOGURE M. (1933) The influence of light and temperature on certain characters of silkworm *Bombyx mori* L., J. Dept. Agri. Kyusu. Uni. 4 : 1 - 93.
- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing CSRTI Bull. No 2.
- MATSUMURA S., ISHIZUKA (1929) The effect of temperature on development of *Bombyx mori*. Report Nagano. Seri. Exp. Sta. JPN. 19.

- MATSUMURA S., TANAKA S., KOSAKA T., SUZUKI S. (1958) Relation of rearing conditions to the ingestion and digestion of mulberry leaves in the silkworm. *Sanshi. Shikenjo. Hokaku. Tech. Bull.* 73 : 1 - 40.
- MUNIRAJU E. (1995) Studies on standardisation of rearing methods of young age silkworm *Bombyx mori* L. Ph. D. Thesis submitted to Bangalore University, Bangalore, India. pp 54 - 83.
- NAIK P. R., DELVI M. R. (1987) Food utilization in different races of silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera : Bombycidae) *Sericologia*, 27 (3) : 391 - 397.
- PERIYASWAMY K., NARAYANA PRAKASH R., RADHAKRISHNA S. (1984) Food utilization in exotic and indigenous races of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera : Bombycidae) *Sericologia*, 24 : 43 - 50.
- RAPUSAS H. R., GABRIEL B. P. (1976) Suitable temperature, humidity and larval density in the rearing of *Bombyx mori*, Philippine agriculturists, 60 (3/4) : 130 - 138.
- SEKHARAPPA B. M., MUNIRAJU E., GURURAJ C. S. (1995) Use of an 'Isolation chamber' for rearing young age (Chawki) silkworms in the tropics. *Sericologia*, 35 (3) : 525 - 534.
- SIGEMATSU H., TAKESHITA H. (1967) On the growth of silk glands and silk proteins production by silkworms reared at various temperatures during the fifth instar, *Acta. Sericologia. Jap.* 65 : 125 - 128.
- SIDHU N. S., SONWALKER T. N. (1969) A preliminary note on the investigations of degumming loss in indigenous and exotic hybrid cocoons of silkworm. *Information bulletin* (1).
- SONWALKER T. N. (1969) Investigations on degumming loss and spinning performance of pierced and cut cocoons of silkworm *Bombyx mori* L. *Ind. J. Seric.* 7 (1) : 43 - 47.
- SUNDARAJ N., NAGARAJU S., VENKATARAMU M. N., JAGANATH M. K. (1972) Design and analysis of field experiments. Pub. By University of Agriculture Science, Bangalore. p 424.
- UEDA S. (1963) Studies on the effects of rearing temperature upon the health of silkworm larvae and upon the amount of cocoon silk production - III on the effects of lower rearing temperature. *J. Seri. Sci. Japan*, 33 (1) : 34 - 42.
- UEDA S., HARIZUKA H. (1962) Studies on the effects of rearing temperature affecting the health of silkworm larvae and upon the quality of cocoons - I, Effect of temperature in each instar. *Acta. Sericologia. Jap.* 41 : 6 - 21.
- UEDA S., KIMURA R., SUZUKI K. (1969) Studies on the growth of the silkworm *Bombyx mori* L. - II. The influence of the rearing condition upon the larval growth, productivity of silk substance, eggs and boiled off loss in the cocoon shell. *Bull. Sericul. Exp. Sta.*, 23 (3) : 290 - 293.
- UEDA S., SUZUKI K. (1967) Studies on the growth of the Silkworm *B. Mori* L. - I Chronological changes of the amount of food ingested and digested, body weight and water content and their mutual relationships. *Bull. Seri. Exp. Sta.* 22 (1): 65 - 67.
- VENUGOPALA PILLAI S., KRISHNASWAMI S. (1987) Adaptability of silkworm *Bombyx mori* (L) to tropical conditions III, Studies on the effect of high temperature during later developmental stages of silkworm, *Ind. J. Seric.*, 26 (2) : 63 - 71.
- VERMA A. N., ATWAL A. S. (1967) Effect of constant and variable temperature on the development and silk production of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) *J. Res. Punjab Agri. Uni.* 4: 233 - 239.
- YAMAMOTO T., FUJIMAKI T. (1962) Inter strain difference in food efficiency of the silkworm *Bombyx mori* L. reared on artificial diet, *J. Sericul. Sci. Jpn.* 51 : 312 - 315.

EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA CONVERSION FEUILLES - SOIE CHEZ *BOMBYX MORI* L.

E. MUNIRAJU, B. M. SEKHARAPPA & R. RAGHURAMAN

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore - 560 062, Inde.

*Une des propriétés importantes du ver à soie **Bombyx mori** L. est son efficacité à convertir les feuilles de mûrier en soie en raison de la valeur commerciale de celle-ci. L'efficacité de la conversion est influencée par des facteurs tels que la race du ver à soie, la qualité de la feuille de mûrier et les conditions d'élevage. Parmi ces dernières, la température joue un rôle important dans la conversion des feuilles en soie. Les vers à soie Pure Mysore (PM), une race multivoltine et NB4D2, une race bivoltine (BV), ont été élevés sous une température constante de 26, 28, 30 ou 32° C pendant les premiers stades ainsi que sous des températures combinées pendant les stades avancés, afin de comprendre l'effet de la température sur la conversion feuilles-soie et sur la survie. Une température basse (26° C) maintenue pendant toute la durée de l'élevage favorise une plus grande conversion (0,062 mg par mg de feuilles absorbées), ainsi qu'un meilleur taux de survie (87 %) pour la race bivoltine, alors que pour la race multivoltine, ceci est obtenu avec une température de 32° C pendant les premiers âges, puis de 26° C pendant les derniers, avec un taux de survie de 94,4 %. Une corrélation négative pour le taux de survie et le rendement en cocons a été observée lorsqu'on augmente la température jusqu'à 32° C ; au-delà de ce seuil, la température devient mortelle pour la race bivoltine. L'étude présente fait part de ces résultats.*

INTRODUCTION

La température du corps des vers à soie varie avec la température ambiante. Les activités physiologiques, l'absorption de nourriture et les paramètres économiques sont influencés par la température du corps des vers à soie (Anonymous, 1972). Pendant l'élevage, l'effet de la température sur le taux de survie, la croissance, la production de cocons et la qualité de la soie, a été étudié par plusieurs scientifiques (Matsumura et Ishizuka, 1929 ; Kogure, 1933 ; Matsumura et coll., 1958 ; Ueda, 1963 ; Ueda et Harizuka, 1962 ; Yamamoto et Fuzimaki, 1962 ; Verma et Atwal, 1967 ; Sigematsu et Takeshita, 1967 ; Rapusas et Gabriel, 1976 ; Muniraju, 1995). Ils notèrent une production peu abondante de soie lorsque les insectes étaient élevés sous de hautes températures et suggérèrent 24 - 26° C comme températures optimum pour des bons résultats d'élevage.

Le taux de conversion feuilles-soie du ver à soie est une caractéristique physiologique complète, ainsi qu'un index économique important pour la production de cocons. En général, une larve ingère entre 20 - 25 g de feuilles de mûrier fraîches, dont plus de 85 % pendant le cinquième stade, âge pendant lequel la glande séricigène croît considérablement et la soie est synthétisée. La conversion en soie est déterminée par la température, le facteur environnemental le plus important. Lorsque la température augmente (20 - 30° C), le taux de conversion feuille-soie diminue (Ueda et Suzuki, 1967 ; Junliang et Xiaofeng, 1992 ; Muniraju, 1995). Sigematsu et Takeshita (1967) ont fait ressortir qu'une augmentation de l'ingestion des feuilles de mûrier pendant les derniers âges allait de paire avec une diminution des températures d'élevage. L'ingestion de la nourriture, ainsi que l'adaptabilité

aux changements de l'environnement varie selon les différentes races de vers à soie (Periyaswamy et coll., 1984 ; Naik et Delvi, 1987).

Des études antérieures ont invariablement évalué des températures constantes pendant les derniers âges d'élevage pour l'efficacité de la conversion. Ici, une tentative a été faite afin de comprendre l'effet de températures constantes et de leurs combinaisons pendant les différents stades de développement, sur la conversion feuille - soie chez les races bivoltine et multivoltine.

MATERIELS ET METHODES

Des larves de NB4D2, une race bivoltine et de Pure Mysore, une race polyvoltine ont été exposées à des températures constantes ainsi qu'à des combinaisons de températures constantes pendant les premiers âges (de l'éclosion à l'achèvement de la troisième mue) et les derniers âges (du commencement du quatrième stade au début du filage des cocons) d'absorption de nourriture. Le taux d'ingestion des feuilles, de survie et de la conversion feuille - soie ont été évalués. Afin de maintenir des températures constantes et l'humidité voulue, des "chambres d'isolement", contrôlées thermostatiquement (Sekharappa et coll., 1995) ont été utilisées. Les vers ont été nourris *ad libitum* pendant toute la période d'élevage à l'intérieur de la chambre. Les méthodes standard d'élevage ont été suivies (Krishnaswami, 1978), sauf en ce qui concerne la température. Les traitements sélectionnés furent comme suit :

Traitement	Elevage des premiers âges Température (° C)	Elevage des derniers âges Température (° C)
1a	26	26
1b	26	28
1c	26	30
1d	26	32
2a	28	26
2b	28	28
2c	28	30
2d	28	32
3a	30	26
3b	30	28
3c	30	30
3d	30	32
4a	32	26
4b	32	28
4c	32	30
4d	32	32

Afin d'évaluer l'effet de la température pendant l'élevage sur la conversion feuille - soie, l'ingestion totale des feuilles sèches pendant toute la période larvaire (pour tous les âges) a été prise en considération. La conversion feuille - soie a été évaluée en utilisant la formule :

$$\text{Taux de conversion feuille - soie} = \frac{\text{Poids de la coque (séchée au four)}}{\text{Absorption totale de nourriture (poids sec)}} \times 100$$

Pour l'estimation du taux de conversion feuille - fibroïne, quatre répétitions de vingt cinq coques chacune ont été décreusées (en utilisant 1 % de savon et 1 % d'une solution de carbonate de sodium) afin de leur appliquer des traitements différents (T1 à T4) (Anonymous, 1982 ; Sonwalker, 1969 ; Sidhu et Sonwalker, 1969). Elles furent ensuite séchées au four à 100° C jusqu'à ce qu'un poids constant soit atteint. La formule utilisée pour évaluer les différents paramètres inclut :

$$\text{Taux de conversion feuille - fibroïne} = \frac{\text{Poids de la fibroïne}}{\text{Absorption totale de nourriture (poids sec)}} \times 100$$

$$\text{Taux de conversion feuille - sérécine} = \frac{\text{Poids de la sérécine}}{\text{Absorption totale de nourriture}} \times 100$$

$$\text{Poids de la sérécine} = \text{Poids de la coque} - \text{Poids de la fibroïne}$$

$$\text{Taux de perte au décreusage} = \frac{\text{Poids de la sérécine}}{\text{Poids de la coque}} \times 100$$

Les données obtenues furent analysées statistiquement (Sundaraj et coll., 1972) et sont présentées.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les effets de la température pendant l'élevage sur la conversion des feuilles de mûrier en soie sont présentés dans les Tableaux I & II. Chez Pure Mysore, l'absorption des feuilles est graduellement réduite avec l'augmentation des températures constantes d'élevage (Tableau I). Une réponse similaire a également été enregistrée en ce qui concerne le poids de la coque. L'absorption de feuilles de mûrier et la conversion en coques sont meilleures avec le traitement à 32 - 26° C (0,046 mg de coque par mg de feuille ingérée) en comparaison avec le traitement à 26 - 32° C (157 mg de soie produite par 3045 mg de feuilles ingérées). L'ingestion maximum de feuilles a été enregistrée chez un groupe élevé à la température constante la plus haute (32° C). L'ingestion de feuilles et le poids de la coque ont été réduits pour les groupes élevés sous basse température pendant les premiers âges, puis sous haute température pendant les derniers âges. Une variation marginale des taux de conversions feuille - soie et feuille - fibroïne entre les traitements a été observée.

Un examen attentif du Tableau II indique que l'ingestion de feuilles chez NB4D2 est maximum (6165 mg par larve) à 26 - 26° C, tandis qu'elle est minimum (3365 mg) à la température la plus haute testée (32 - 32° C). Chez NB4D2, l'ingestion de feuilles est au maximum (6372 mg) lorsque les insectes sont élevés à 28 - 26° C et au plus bas (3365 mg) à 32 - 32° C. Les taux de conversion feuille - soie et feuille - fibroïne diminuent lorsque les températures augmentent. La valeur de la teneur absolue en soie, varie selon la quantité de feuilles ingérées. La perte au décreusage (pourcentage) est généralement plus élevée chez Pure Mysore que chez NB4D2, sans tenir compte des traitements. Cependant, il n'existe pas de tendance claire en rapport avec la température.

Durée de la période larvaire :

Pour les races PM et NB4D2, la durée de la période larvaire est maximum (658 et 553 heures respectivement) aux températures constantes les plus basses testées (26° C). La durée minimum de la période larvaire de 499 et de 451 heures a été enregistrée pour PM et NB4D2 respectivement lorsque

les insectes ont été élevés à une température constante de 32° C. Ainsi que précédemment rapporté par des scientifiques ainsi que dans l'étude présente, la durée de la période larvaire diminue lorsque la température augmente. Cependant, la réponse est fonction de la race. Par exemple, la race PM élevée à 32° C a montré une réduction maximum (de 58 heures) de la période larvaire, en comparaison avec la même race élevée à 26° C durant toute la période larvaire. Chez des vers élevés à 26° C pendant leurs premiers âges, la durée de leur période larvaire diminue elle aussi lorsqu'on augmente la température, en comparaison avec un élevage maintenu à une température de 26° C pendant toute la période larvaire. La réduction maximum de 70 heures de la période larvaire a été enregistrée pour des insectes élevés à 26° C durant les premiers âges et à 32° C durant les derniers âges. Chez les races bivoltine élevées à une température constante de 32° C, une réduction de 102 heures a été enregistrée en comparaison avec des insectes élevés à 26° C pendant toute la période larvaire. En conséquence, il existe une corrélation directe entre la réponse métabolique du poïkilotherme et la température. Ces résultats sont similaires à ceux des recherches précédentes de Venugopalapilli et de Krishnaswami (1987), de Hanumappa (1988) et de Bhasker et coll., (1992).

Conversion feuille - soie :

La conversion des feuilles en soie est déterminée par des facteurs tels que la race du ver à soie, la qualité de la feuille du mûrier et l'environnement de l'élevage. La température influence le taux de conversion des feuilles en soie (Ueda et coll., 1969 ; Junliang et Xiaofeng, 1992). L'étude présente montre que Pure Mysore, une race tropicale, bien qu'influencée par les températures ambiantes a des résultats plus rapprochés à des températures différentes en comparaison avec la race bivoltine. Chez PM, l'ingestion de nourriture et le poids de la coque à une combinaison de 26 - 26° C sont de 3389 et 158 mg respectivement. Ceci tombe à 3045 et 157 mg par larve à une combinaison de 26 - 32° C. Par contraste, l'ingestion des feuilles et le poids des coques pour la race bivoltine à 26 - 26° C sont de 6165 et de 379 mg et chutent à 4490 et 275 mg lors d'une combinaison de 26 - 32° C. D'après les données il est très clair que PM, une race tropicale a une plus grande adaptabilité aux températures plus hautes avec un taux métabolique plus élevé et une demande d'énergie plus grande pour sa survie ce qui a pour effet une consommation accrue mais un rendement diminué en soie. Aux températures recommandées d'élevage (28 - 26° C), la race bivoltine donne une meilleure conversion en soie, où 17,41 g (poids sec) de feuilles sont ingérés (efficacité de 5,74 %). Des études antérieures ont également montré que la conversion des feuilles en soie varie selon la race du ver à soie et la variété de mûrier utilisé (Junliang et Xiaofeng, 1992).

Pendant les premiers âges, les larves élevées à 26° C puis à des températures légèrement plus élevées (28 - 30° C) durant les derniers âges, ont donné de meilleurs résultats lorsqu'on les compare à un régime de hautes températures constantes (32 - 32° C). Ce phénomène peut être mis en corrélation avec les observations sur le terrain. Dans des pays tropicaux tels que l'Inde, la température enregistrée augmente graduellement pendant le mois de mars pour atteindre un sommet en avril / mai. Des pontes levées pendant les mois plus frais comme celui de février donnent une meilleure production de soie bien qu'une température relativement plus élevée soit enregistrée pendant les derniers âges. Cependant, l'élevage pendant des mois plus chauds résulte en une production pauvre en soie.

La race bivoltine a un meilleur taux de conversion feuille - soie par rapport à la race multivoltine. Pour la race bivoltine, le taux de conversion se situe dans un éventail de 5,5 à 6,7 % et de 4,5 à 5,0 % pour la race multivoltine. Une tendance similaire est également observée en ce qui concerne le taux de conversion feuille - fibroïne. La teneur en sérécine des races bivoltine et multivoltine n'est pas altérée lorsqu'elle est étudiée sous des températures différentes.

Il est évident d'après l'étude présente, que lorsque la température dépasse 30° C pendant les derniers âges, les vers devront être élevés à une température inférieure à 26° C, pendant les premiers âges, pour une adaptabilité et une productivité meilleures.

EFFECT OF SOME PLANT GROWTH REGULATORS ON PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY AND CHLOROPHYLL CONTENT IN MULBERRY, *MORUS ALBA*

M. SETUA¹, C. DAS¹, B. K. MANDAL² AND D. C. GHOSH³

1. Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, India.
2. Agronomy Department, BCKV, Mohanpur - 741252, West Bengal, India.
3. Agronomy Department PSB, Sriniketan - 731236, West Bengal, India.

*A study was undertaken at the Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal in two different seasons (September - November and December - February), 1992/93 and 1993/94 to find out the effect of some plant growth regulators on important physio - biochemical parameters in mulberry (*Morus alba* L.). NAA(Naphthalene Acetic acid) - based plant growth regulator at 0.025% concentration enhanced maximum rate of photosynthesis (PN) and gas exchange efficiency (PWUE: Photosynthetic water use efficiency). Chlorophyll content, total soluble sugar and relative water content (RWC) were also found to be increased through kinetin, auxin and triacontanol - based plant growth regulators (PGRs). Photosynthetic rate was directly correlated with PWUE, total chlorophyll and total soluble sugar which were also found to be positively correlated with each other indicating better efficiency of NAA and kinetin on photosynthetic activity over control.*

Keywords: Photosynthesis, water use efficiency, growth regulator, relative water content

INTRODUCTION

The investigation of the regulatory role of plant growth regulators on photosynthesis, which began recently (Saroop *et al.*, 1994; Chernyad'ev, 1994) is of practical interest because of improved plant productivity. Plant growth regulators may be applied to enhance photosynthetic rate during the active growth phase or under unfavourable natural conditions (Chernyad'ev, 1989).

Delayed senescence is considered to be one of the desirable traits of higher productivity, especially for mulberry when leaf is treated as sole food for silkworm (*Bombyx mori* L.). Foliar applications of growth regulators have been reported to delay senescence and thus aid in enhancing photosynthesis, chlorophyll content and water status as well as the translocation of photosynthates for improved yield (Debata & Murty, 1981). Plant growth regulators affect the photosynthetic rate (PN), pigment contents (Pospisilova *et al.*, 1993), photochemical activity (Chernyad'ev, 1994), water and nutrient uptake (Ericksen *et al.*, 1981). The objective of this study was to evaluate the effects of four synthetic growth regulators on photosynthesis, photosynthetic water - use efficiency, chlorophyll content and water status in mulberry plants, cv. S1.

MATERIALS AND METHODS

Six month old mulberry saplings (cv. S1) raised in nursery, were transplanted in the experimental field at 60 × 60 sq. cm spacings in a randomised block design (RBD) with four replications. The soil was sandy loam with pH 7.6. Usual practice for irrigated garden was followed. Four growth regulators (NAA at 0.025% -T₁, kinetin at 0.05% -T₂, triacontanol at 0.05% -T₃ and sterol - based triacontanol

at 0.05% - T4) were sprayed on newly sprouted leaves at 15 days after pruning (DAP). Three consecutive sprays at 15 days interval were given. The untreated plants served as control (T0). Measurements were taken at 60 DAP. Single leaf CO₂ exchange rate (photosynthesis - PN) was measured by using a LI - 6200 portable photosynthesis system (Li - Cor, Lincoln, NE, USA) at 10.00 to 13.00 h when the photon flux density rate (PAR) was in the range 1200 - 2000 $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ and the leaf chamber temperature was 20 - 25° C. Gas exchange efficiency (PWUE) was estimated as the ratio of photosynthesis: transpiration A: T (Fischer & Turner, 1978). The chlorophyll and sugar contents were measured spectrophotometrically by the methods of Arnon (1949) and Yemm & Willis (1954), respectively. Relative water content was measured by the method described by Barrs (1968).

Data on physio - biochemical parameters recorded in the experiments were analysed statistically through variance ratio test (Goulden, 1952; Cochran and Cox, 1959). Computation of critical difference (CD) at 5% significance to compare the different treatment means were made with the consultation of Fisher and Yates's table. To measure the degree of relationships between different parameters, value of co-efficient of correlation (r) was analysed (Panse and Sukhatame, 1967).

RESULTS AND DISCUSSION

Foliar sprays of PGRs in the study found to be significantly increased photosynthetic rate, chlorophyll content and leaf area which confirmed the observation of Debata & Murty (1981).

Influence of growth regulators on photosynthesis:

The results (Table I) revealed that maximum photosynthesis at 60 DAP was found in plants sprayed with NAA in comparison with the other three PGRs over control, during two seasons of both years except the September - November season of 1993/94. This may be due to changes in carboxylation and phosphorylation activities and also enzyme synthesis. This result corroborates the work of Treharne (1978) and Ericksen *et al.* (1981).

Table I. Photosynthesis ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) of mulberry leaves as influenced by plant growth regulators at 60 DAP.

Tableau I. Influence sur la photosynthèse ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) des feuilles de mûrier, des régulateurs de croissance végétaux 60 jours après la taille

Treatments	1992 / 93		1993 / 94	
	Sep. - Nov.	Dec. - Feb.	Sep. - Nov.	Dec. - Feb.
<i>Traitements</i>				
T0	8.00	13.86	8.60	10.40
T1	13.30	19.02	11.84	19.00
T2	14.00	18.24	10.49	12.70
T3	11.40	17.90	10.06	12.30
T4	10.30	14.65	9.66	12.60
S. E. (12 D. F.)	0.937	0.757	1.360	1.057

S. E. (12 D. F.): 12 Degree of freedom / Ecart - type 12 degrés de liberté.

Influence of growth regulators on photosynthetic water - use efficiency and relative water content:

Generally leaf water - use efficiency and relative water content resulted in desired moisture availability in mulberry leaves and thus maintained quality for silkworm rearing during the favourable seasons (autumn & spring). In the study, growth regulators such as NAA, kinetin and triacontanol significantly increased the PWUE and RWC of leaves. The results indicated that leaf water - use efficiency was found to be influenced by NAA and its precursors, kinetin and triacontanol during both seasons and years of investigation (Tables II and III). Similar results were obtained by Misra *et al.* (1992, 1993) and Rao *et al.* (1992).

Influence of growth regulators on chlorophyll content:

Application of growth regulators such as NAA, kinetin and triacontanol - based PGRs brought a significant increase in the chlorophyll content of leaves and was found statistically significant over control through ANOVA (Table IV). This may be due to an increase in the Fe content of the leaves (Menon & Srivastava, 1984) and also due to increase in plastoquinone - 9 and carotenoids content which enhanced the activity of PS1 (Photosystem I) and PS2 (Photosystem II) as stated by Saroop *et al.* (1994).

Influence of growth regulators on soluble sugar content:

Total soluble sugar also appeared to be one of the major biochemical constituents for health and vigour of silkworms (Ito, 1978). In this experiment, PGRs also increased the total soluble sugar content of leaves over control (Table V). This increase in total soluble sugar might be due to cumulative effect of increased rate of photosynthesis and chlorophyll content resulted enhancement of the key photosynthetic enzyme RUBPCO (Ribulose bi - phosphate carboxylase). The result corroborated the findings of Menon & Srivastava (1984) and Misra *et al.* (1992, 1993).

Table II. Photosynthetic water-use efficiency ($\mu\text{mol} \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$) as influenced by plant growth regulators at 60 DAP.

Tableau II. Mesure de l'influence des régulateurs de croissance végétaux sur l'efficacité photosynthétique de l'utilisation de l'eau ($\mu\text{mol} \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{mol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$), 60 jours après la taille.

Treatments <i>Traitements</i>	1992/93		1993/94	
	Sep. - Nov.	Dec. - Feb.	Sep. - Nov.	Dec. - Feb.
T ₀	0.184	0.405	0.179	0.313
T ₁	0.271	0.386	0.246	0.493
T ₂	0.321	0.384	0.221	0.355
T ₃	0.256	0.409	0.216	0.333
T ₄	0.200	0.371	0.218	0.355
S. E. (12 D. F.)	0.035	0.035	0.028	0.043

Table III. Relative water content (%) as influenced by plant growth regulators at 60 DAP.

Tableau III. Influence des régulateurs de croissance végétaux sur la teneur relative en eau (%), mesurée 60 jours après la taille.

Treatments	1992/ 93		1993/94	
	Sep. - Nov.	Dec. - Feb.	Sep. - Nov.	Dec. - Feb.
<i>Traitements</i>				
T ₀	76.1	78.1	77.3	74.3
T ₁	79.0	86.8	93.7	81.6
T ₂	77.2	93.8	91.0	80.2
T ₃	76.5	79.4	92.9	82.3
T ₄	77.8	82.9	83.9	80.3
S. E. (15 D. F.)	1.900	3.110	0.966	0.950

Table IV. Total chlorophyll content (mg . g⁻¹ . f . wt) of mulberry leaves as influenced by plant growth regulators.

Tableau IV. Influence des régulateurs de croissance végétaux sur la teneur totale en chlorophylle (mg . g⁻¹ . poids frais) des feuilles de mûrier .

Treatments	1992/93		1993/94	
	Sep. - Nov	Dec. - Feb.	Sep. - Nov.	Dec. - Feb.
<i>Traitements</i>				
T ₀	1.20	1.80	1.50	1.60
T ₁	1.88	2.50	1.80	2.40
T ₂	2.25	2.00	2.00	2.10
T ₃	1.87	2.10	1.70	2.20
T ₄	1.93	2.60	1.70	2.30
S. E. (15 D. F.)	0.057	0.063	0.070	0.088

Table V. Total soluble sugar content (mg . g⁻¹ f. wt) of mulberry leaves as influenced by plant growth regulators.

Tableau V. Influence des régulateurs de croissance végétaux sur la teneur en sucres totaux solubles (mg . g⁻¹ . poids frais) des feuilles de mûrier.

Treatments	1992/93		1993/94	
	Sep. - Nov.	Dec. - Feb.	Sep. - Nov.	Dec. - Feb.
<i>Traitements</i>				
T ₀	18.51	24.20	19.13	22.07
T ₁	33.48	40.00	24.80	36.67
T ₂	32.98	44.60	19.55	27.75
T ₃	30.82	30.20	30.13	29.22
T ₄	26.92	33.80	21.48	24.70
S. E. (15 D. F.)	2.590	1.343	1.970	0.911

Table VI. Correlation coefficients between physio - biochemical parameters as influenced by plant growth regulators.

Tableau VI. Influence des régulateurs de croissance végétaux sur les coefficients de corrélation entre des paramètres physio - biochimiques.

	Photosynthesis	PWUE	RWC	Chlorophyll	Sugar
	<i>Photosynthèse</i>			<i>Chlorophylle</i>	<i>Sucre</i>
Photosynthesis	1.00				
<i>Photosynthèse</i>					
PWUE	0.88	1.00			
RWC	0.21	-0.01	1.00		
Chlorophyll	0.73	0.70	0.17	1.00	
<i>Chlorophylle</i>					
Sugar / <i>Sucre</i>	0.83	0.61	0.31	0.64	1.00

PWUE: Photosynthetic water use efficiency / *Utilisation photosynthétique de l'eau.*

RWC: Relative water content / *Teneur relative en eau.*

Correlation coefficients between physio - biochemical parameters:

The correlation study revealed that the rate of photosynthesis was found to be directly correlated with water - use efficiency, chlorophyll content and total soluble sugar (Table VI). Photosynthetic water - use efficiency, chlorophyll and sugar contents were also found to be correlated with each other due to the influence of growth regulators on photosynthetic rate.

It is apparent from the study that there was a considerable increase in the rate of photosynthesis through a foliar spray of NAA - based PGR, which also improved the productivity and yield of mulberry as found by Wade (1973).

It is thus concluded that plant growth regulators such as NAA (planofix) followed by kinetin (Biozyme crop plus) have a significant influence on photosynthesis, leaf water - use efficiency, RWC, chlorophyll and total soluble sugar of S1 mulberry leaves.

REFERENCES

- ARNON D. I., (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24, 1 - 15.
- BARRS H. D., (1968) Determination of water deficits in plant tissues. In *Water Deficits and Plant Growth*, Volume I (Ed. T. T. Kozlowski), pp. 235 - 254. New York: Academic press.
- CHERNYAD'EV I. I., (1989) Photosynthesis regulation by synthetic cytokinins and increase in plant productivity. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 25, 147 - 165. [In Russian].
- CHERNYAD'EV I. I. (1994) Effect of 6 - benzylamino - purine and thiadiazuron on photosynthesis in crop plants. *Photosynthetica* 30, 287 - 292.
- COCHRAN W. G. & COX G. M. (1959) *Experimental Designs*. John Wiley and sons. New York.
- DEBATA A. & MURTY K. S. (1981) Effect of growth regulators on photosynthetic efficiency, translocation and senescence in rice. *Indian Journal of Experimental Biology* 19, 986 - 989.
- ERICKSEN A. B., SELLDEN G., SKOGEN D. & NILSEN S. (1981) Comparative analysis of the effect of triacontanol on photosynthesis, photorespiration and growth of tomato (C - 3 plants) and maize (C - 4 plants). *Planta* 152, 44 - 49.
- FISCHER R. A. & TURNER N. C. (1978) Plant productivity in the arid and semi-arid zones. *Annual Review of Plant Physiology* 29, 277 - 317.
- GOULDEN C. H. (1952) *Methods of statistical analysis*. John Wiley and Sons, New York.
- ITO T. (1978) Silkworm nutrition, In *the silkworm: an important laboratory tool* (Ed. Y. Tazima), pp. 121 - 157. Kodansha Limited, Tokyo.
- MENON K. K. G. & SRIVASTAVA H. C. (1984). Increasing plant productivity through improved photosynthesis. *Proceedings of Indian Academy of Sciences (Plant Science)* 93, 359 - 378.
- MISRA A. K., DAS B. K. & AHSAN M. H. (1992) Growth and yield of mulberry (*Morus alba* L.) as influenced by commercial plant growth regulator. *National Conference on Mulberry Sericulture Research* C. S. R. & T. I., Mysore.
- MISRA R. K., SHUKLA P., CHOUDHURY P. C., DAS P. K., SINGH G. B., BAJPAI A. K. & DATTA R. K. (1993) Studies on the effect of commercial formulations of triacontanol on quality and yield of mulberry (*Morus indica* L. var. Kanva - 2). *Indian Journal of Sericulture* 32, 156 - 161.
- PANSE V. G. & SUKHATAME P. V. (1967) *Statistical methods for Agricultural workers*. I. C. A. R., New Delhi.
- POSPISILOVA J., CATSKY J., SYNKOVA I. I., MACHACKOVA I. & SOLARVOVA J. (1993) Gas exchange and *in vivo* chlorophyll fluorescence in potato and tobacco plantlets *in vitro* as affected by various concentration of 6 - benzylaminopurine. *Photosynthetica* 29, 1 - 12.
- RAO N. B. V., SANAULLA H. & BONGALE U. D. (1992) Studies on the effect of certain growth promoting foliar sprays on mulberry. *National Conference on Mulberry Sericulture Research*, C. S. R. & T. I., Mysore.

- SAROOP S., THAKER V. S., CHANDA S. V., VAISHNAV P. P. & SINGH Y. D. (1994) Development of photosynthetic electron transport reactions under the influence of phytohormones during greening of cotyledons of *Brassica juncea*. *Photosynthetica* 30, 193 - 200.
- SEKI H. & OSHIKANAE K. (1959) Research Reports, Faculty of Textile in Sericulture, Shinshu University, Japan. 9, 6 - 15.
- TREHARNE K. J. (1978) In opportunities for chemical plant growth regulation. Proceedings of a joint BCPC and BPGR Symposium, Monograph 21. British crop protection council, pp. 153 - 158.
- WADE N. (1973) Agriculture - critics find basic research stunted and wilting. *Science* 180, 390 - 393.
- YEMM E. & WILLIS A. J. (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by Anthrone. *Biochemical Journal* 57, 508 - 514.

EFFET DE CERTAINS REGULATEURS DE CROISSANCE VEGETAUX SUR L'EFFICACITE DE LA PHOTOSYNTHESE ET LA TENEUR EN CHLOROPHYLLE DU MURIER, *MORUS ALBA*

M. SETUA¹, C. DAS¹, B. K. MANDAL² & D. C. GHOSH³

1. Central Sericultural Research & Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, Inde.

2. Agronomy Department, BCKV, Mohanpur - 741 252, West Bengal, Inde.

3. Agronomy Department PSB, Sriniketan - 731 236, West Bengal, Inde.

*Une étude a été entreprise au Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, Bengale ouest, à deux saisons différentes (de septembre à novembre et de décembre à février) en 1992 / 93 et 1993 / 94, afin de déterminer l'effet de certains régulateurs de croissance végétaux sur d'importants paramètres physio - biochimiques du mûrier (*Morus alba* L.). Un régulateur de croissance dosé à 0.025 % d'une solution basée sur du NAA (acide naphthalène acétique) augmente le taux maximum de photosynthèse (PN) et l'efficacité des échanges gazeux (PWUE : efficacité de l'utilisation photosynthétique de l'eau). Une augmentation de la teneur en chlorophylle, des sucres solubles totaux et de la teneur relative en eau (RWC) ont également été remarqués, lors de l'utilisation des régulateurs de croissance végétaux (PGRs) à base de kinétine, auxine et triacantanol. Le taux de photosynthèse est directement corrélé avec PWUE, la chlorophylle totale et les sucres solubles totaux sont corrélés positivement entre eux, ce qui indique une meilleure efficacité de NAA et de la kinétine sur l'activité photosynthétique, par rapport aux témoins.*

INTRODUCTION

Le rôle régulateur des régulateurs de croissance végétaux sur la photosynthèse fut l'objet d'une étude approfondie qui débuta récemment (Saroop et coll., 1994 ; Chernyad'ev, 1994). Elle est d'un intérêt pratique en raison de l'amélioration de la productivité des plantes. Les régulateurs végétaux de croissance peuvent être appliqués pendant la phase active de croissance ou lors de conditions naturelles défavorables, afin d'augmenter le taux de photosynthèse (Chernyad'ev, 1989).

Une sénescence tardive est considérée comme l'une des caractéristiques souhaitables d'une productivité accrue, particulièrement chez le mûrier lorsque les feuilles constituent l'unique nourriture du ver à soie (*Bombyx mori* L.). Il a été rapporté que les applications foliaires de régulateurs de croissance retardaient la sénescence et par voie de conséquence, contribuaient à l'augmentation de la photosynthèse, de la teneur en chlorophylle et de l'eau, ainsi qu'à la translocation des photosynthats qui améliorent le rendement (Debata & Murty, 1981). Les régulateurs de croissance végétaux affectent le taux de photosynthèse (PN), la teneur en pigments (Pospisilova et coll., 1993), l'activité photochimique (Chernyad'ev, 1994), et le captage de l'eau et des matières nutritives (Ericksen et coll., 1981). L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets de quatre régulateurs de croissance de synthèse, sur la photosynthèse, sur l'efficacité de l'utilisation photosynthétique de l'eau, sur la teneur en chlorophylle et sur le statut de l'eau chez le mûrier, cv. S1.

MATERIELS ET METHODES

Des plants de mûrier âgés de 6 mois (cv. S1) cultivés en pépinières, ont été transplantés dans un champ expérimental, espacés de $60 \times 60 \text{ cm}^2$ en blocs aléatoires (RBD) sous forme de quatre répétitions. Le sol est sablonneux, de pH 7,6. Les méthodes usuelles pour les plantations irriguées ont été suivies. Quatre régulateurs de croissance (du NAA à 0,025 % - T₁, de la kinétine à 0,05 % - T₃ et du triacontanol à base de stérol à 0,05 % - T₄) ont été vaporisés sur des jeunes feuilles, 15 jours après la taille (DAP). Trois vaporisations consécutives à 15 jours d'intervalle ont été effectuées. Les plants non traités ont servi comme témoin (TO). Des mesures ont été prises à 60 DAP (jours après la taille). Le taux d'échange de CO₂ par feuille (photosynthèse - PN) a été mesuré en utilisant un système portable LI - 6200 de photosynthèse (Li - Cor, Lincoln, NE, USA) entre 10 h et 13h lorsque le taux de densité du flux de photons (PAR) était dans la tranche comprise entre 1200 et 2000 $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ et lorsque la température de la pièce où les feuilles étaient entreposées se situait entre 20 et 25° C. L'efficacité des échanges gazeux (PWUE) a été estimée en tant que ratio de la photosynthèse / transpiration A : T (Fischer & Turner, 1978). La teneur en chlorophylle a été mesurée spectrophotométriquement par la méthode d'Arnon (1949) et la teneur en sucres par celle de Yemm et Willis (1954). La teneur relative en eau a été mesurée par la méthode décrite par Barrs (1968).

Les données des paramètres physio - biochimiques enregistrées pendant les expériences ont été analysées statistiquement, à l'aide du test de variance (Goulden, 1952 ; Cochran & Cox, 1959). L'estimation de la différence critique (CD) à 5 % du seuil de signification, afin de comparer les différents moyens de traitement, a été réalisée grâce au tableau de Fisher et Yates. Dans le but de mesurer le degré de relations entre les différents paramètres, la valeur du coefficient de corrélation (r) a été analysée (Panse & Sukhatame, 1967).

RESULTATS ET DISCUSSION

Lors de cette étude, il a été remarqué que des vaporisations foliaires de PGRs (régulateurs de croissance végétaux) augmentait de façon significative le taux de photosynthèse, la teneur en chlorophylle et la surface foliaire, ce qui confirme les observations de Debata & Murty (1981).

Influence des régulateurs de croissance sur la photosynthèse :

Les résultats du Tableau I révèlent que la photosynthèse maximum à 60 jours après la taille (60 DAP) apparaît chez les plants vaporisés avec NAA, lorsqu'on les compare avec les trois autres PGRs par rapport aux témoins, pendant les deux saisons des deux années, exceptée celle de septembre à novembre de 1993 / 94. Ceci pourrait être dû à des changements dans les activités de carboxylation et de phosphorylation ainsi que dans la synthèse des enzymes. Ce résultat corrobore les travaux de Treharne (1978) et d'Ericksen et coll. (1981).

Influence des régulateurs de croissance sur l'efficacité de l'utilisation photosynthétique de l'eau et sur sa teneur relative :

Généralement, l'efficacité de l'utilisation de l'eau par les feuilles et leur teneur relative en eau avaient pour conséquence une disponibilité de la quantité d'humidité nécessaire aux feuilles de mûrier et ainsi, maintenait une certaine qualité pour l'élevage des vers à soie pendant les saisons favorables (automne et printemps). Pendant cette étude, les régulateurs de croissance tels que le NAA, la kinétine et le triacontanol augmentèrent de façon significative le PWUE et le RWC des feuilles. Les résultats indiquent que l'efficacité de l'utilisation de l'eau est influencée par NAA et ses précurseurs, la kinétine et le triacontanol pendant les deux saisons des deux années d'investigation (Tableaux II et III). Des résultats similaires furent obtenus par Misra et coll. (1992, 1993) et Rao et coll. (1992).

Influence des régulateurs de croissance sur la teneur en chlorophylle :

L'application de régulateurs de croissance à base de NAA, de kinétine et de triacontanol, apporte une augmentation significative de la teneur en chlorophylle des feuilles, qui est statistiquement significative, par rapport aux témoins selon l'Analyse de Variance (ANOVA - Tableau IV). Ceci pourrait être dû à une augmentation de la teneur en Fe des feuilles (Menon & Srivastava, 1984), mais aussi à une augmentation de la plastoquinone - 9 et de la teneur en caroténoïdes, qui augmentent l'activité de PS1 (photosystème I) et de PS2 (photosystème II), ainsi que Saroop et coll. (1994) l'ont établi.

Influence des régulateurs de croissance sur la teneur en sucres solubles :

Les sucres solubles totaux semblent être l'un des constituants biochimiques majeurs de santé et de vigueur des vers à soie (Ito, 1978). Au cours de cette expérience, les PGR augmentèrent également la teneur des feuilles en sucres solubles totaux, par rapport aux témoins (Tableau V). Cette augmentation des sucres solubles totaux pourrait être due à l'effet cumulé du taux accru de la photosynthèse et de la teneur en chlorophylle, qui elle - même résulterait d'une augmentation de RUBPCO (ribulose di - phosphate carboxylase), l'enzyme clé de la photosynthèse. Les résultats de cette étude confirment ceux de Menon & Srivastava (1984) et ceux de Misra et coll. (1992, 1993).

Coefficients de corrélation entre des paramètres physio - biochimiques :

L'étude de corrélation révèle que le taux de photosynthèse est directement corrélé avec l'efficacité de l'utilisation de l'eau, la teneur en chlorophylle et les sucres solubles totaux (Tableau VI). Il a également été remarqué que l'efficacité de l'utilisation photosynthétique de l'eau, la chlorophylle et la teneur en sucres étaient corrélés entre eux, et que ceci était dû à l'influence des régulateurs de croissance sur le taux de photosynthèse.

Il est clair, d'après cette étude, qu'il existe une augmentation considérable du taux de la photosynthèse grâce à la vaporisation foliaire d'un PGR à base de NAA, qui améliore également la productivité et le rendement des mûriers, ainsi que Wade (1973) l'avait découvert.

En conséquence, il est conclu que les régulateurs de croissance végétaux tels que le NAA (Planofix), joint à la kinétine (Biozyme culture plus) ont une influence significative sur la photosynthèse, l'efficacité de l'utilisation de l'eau par les feuilles, le RWC, la chlorophylle et les sucres solubles totaux des feuilles de mûrier de la variété S1.

HISTOCHEMISTRY OF MULBERRY LEAF INFECTED BY RUST

K. V. PRASAD, B. R. DAYAKAR YADAV* & S. B. SULLIA**

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura, Bangalore
560 062, India.

The rust fungus *Peridiopsora mori* Barclay (Prasad et al.), a biotroph on mulberry (*Morus alba* L.) is epidemic during August to February every year causing severe damage to foliage with the appearance of reddish brown pustules during September to January. The infected mesophyll tissue showed depletion of insoluble polysaccharides, proteins, RNA and DNA. The histochemical changes in infected leaf are accompanied by reduction of leaf thickness, size of epidermal cell and number of chloroplasts and proteinoplasts. The inter and intracellular hyphae, hypertrophied mesophyll cells and developing uredinium including urediniospores enclosed by peridium exhibit the presence of polysaccharides, proteins and nucleic acids. The normal mesophyll tissue showed lesser accumulation of these compounds with a transfer of histochemical substances to infected tissues and developing fungal structures. The quantity of carotenoids within the pustule was greater than the uninfected regions of the leaf.

Keywords: Mulberry, rust, hypertrophy, uredinium, histochemistry, morbid anatomy.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus alba* L.) is cultivated for its foliage which forms the sole feed for the silkworms (*Bombyx mori* L.). Mulberry is susceptible to many diseases caused by fungi, of which leaf spot, powdery mildew and leaf rust are most important. The review of literature reveals that rust fungus on mulberry is known to Indian workers as *Aecidium mori* Barclay (Barclay 1891, Rangaswamy et al., 1976), or as *Cerotelium fici* Cast Arthur (Patel et al., 1949). Barclay himself has described rust under *Caeoma mori* (Barclay, 1890) and effected the transfer as *Aecidium mori* Barclay (Syd. & Butler). But the rust fungus prevailing on mulberry in India is not in conformity with generic concepts of either *Aecidium* or *Cerotelium* with the absence of aecial and telial stages. The rust is prevailing in anamorphic state only.

Mulberry leaves infected with the rust fungus expressed the blister like pustule with only uredinium having ostiole through which creamish masses of spores were seen coming out. Mulberry rust uredinium contained cellular peridium enclosing urediniospores that were sessile to sub-sessile, subglobose to pyriform and echinulate to verrucose. The urediniospores were with four germ pores. These features confirmed the identification of the leaf rust fungus as *Peridiopsora mori* Barclay (Prasad et al., 1993). Rust shows maximum severity during August to February each year. Mulberry rust fungus requires moderately high humidity (above 60% RH) and moderate temperature (20 - 26° C) for its rapid development.

* Central Silk Board, Bangalore 560 068, India.

**Department of Microbiology, Bangalore University, Jnana Bharathi Campus, Bangalore 560 056, India.
(Address for correspondence).

The mulberry leaf infected by rust fungus is heterogeneous i.e., it consists of both infected and uninfected tissues and the relative proportions of these two tissues change with the progress of infection. The heterogeneity results from changes occurring within the individual pustules. The interpretation of the physiological processes in rust infected leaves requires the precise knowledge of location and development of pathogen within the leaf in relation to both visible symptoms on leaf and other metabolite changes within the leaf e.g., the accumulation of soluble and insoluble carbohydrates, proteins, nucleic acids etc. Histochemical studies have been undertaken to study the host - pathogen interaction from the above point of view i.e., to study the accumulation of photosynthates and other metabolites.

MATERIALS AND METHODS

To study histochemistry of the healthy and rust infected mulberry leaves, leaf bits of size 1.0×0.5 cm of *Morus alba* L. var M - 5 were collected and fixed in FAA and Carnoy's B - fluid. The dehydration of fixed material was made in ethyl alcohol grades and n - butanol series. The infiltration and embedding of processed material was made with molten paraffin at $58 - 60^\circ \text{C}$, sectioning of the material to $7 \mu\text{m}$ thickness was done using ERMA rotary microtome and sections were affixed to slide by using 1% gelatin and 0.2% potassium dichromate solution. The sections were deparaffinised with xylene, hydrated and subjected to histochemical staining to localize insoluble polysaccharides, proteins and nucleic acids.

Localization and assessing of total insoluble polysaccharides was done by employing Periodic Acid - Schiff's test (PAS - Hotchkiss, 1948). The hydrated sections were placed in 0.4% periodic acid for 25 minutes. The sections were rinsed thoroughly in running water. Then, they were stained in Schiff's reagent for 15 min at room temperature and rinsed in water at $40 - 45^\circ \text{C}$ for 5 min.

The localization and assessing of starch were done by employing Iodine - potassium iodide test (Johansen, 1940). The hydrated sections were passed into iodine solution and placed for 10 - 15 minutes. Then the sections were rinsed and mounted in water.

The localization and assessment of sites containing insoluble proteins was done by employing the mercuric - bromophenol blue staining method (M. B. B. - Mazia *et al.*, 1953). The deparaffinised sections after celloidin (0.3%) coating and air drying were stained with mercuric bromophenol blue for 10 min. The sections were dipped in slightly acidic water and shaken vigorously for development of colour.

The localization and assessment of sites containing nucleic acids was done by employing

(a) Toluidine blue staining method (T. B. - Feder and O' Brien, 1968)

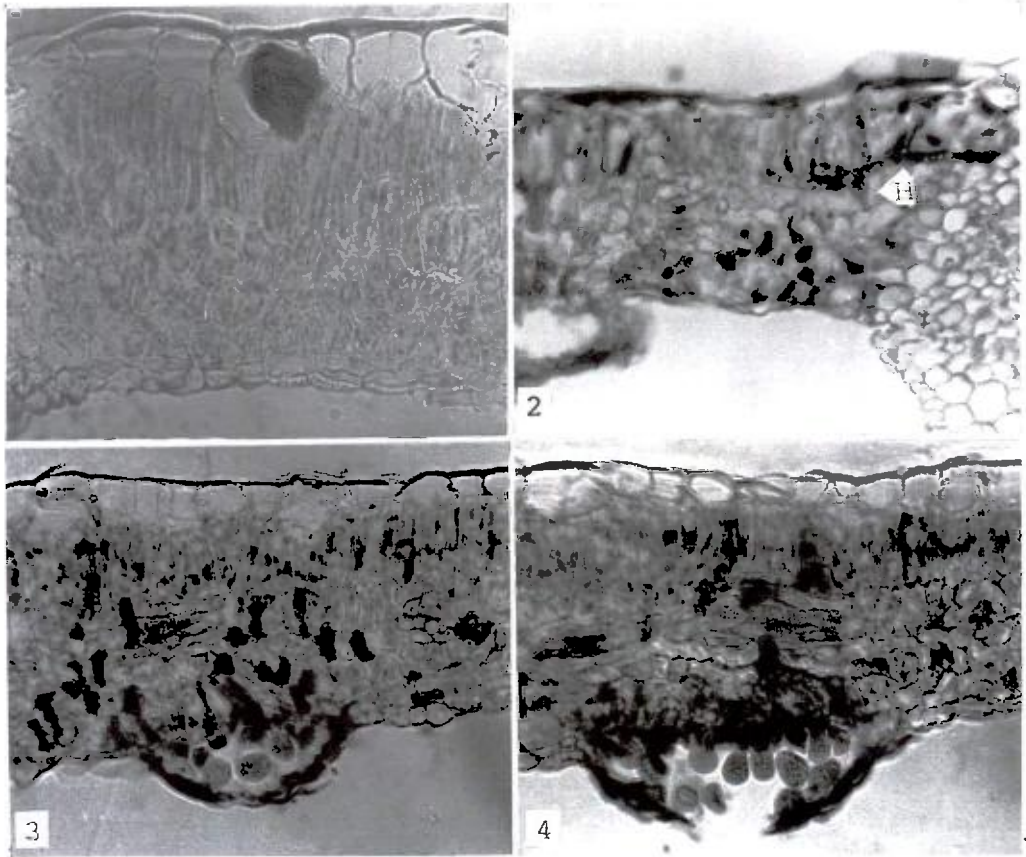
(b) Methyl green - pyronin staining method (M.G.P. - Jensen, 1962).

Toluidine blue is a metachromatic stain which stains both RNA and DNA with a clear contrast. The hydrated sections were stained in 0.1% Toluidine blue solution for 3 - 4 min. Then the sections were rinsed in water by vigorous shaking until the sections were free from excess of stain.

The hydrated sections were stained in methylgreenpyronin solution for 30 min, and stained sections were rinsed in water vigorously to remove excess of stain. The stained sections were dehydrated by passing through ethanol - n - butanol grades, cleared in xylene and mounted in D. P.X.

RESULTS

The mesophyll tissue of mulberry leaves infected by rust showed the presence of mycelium running intra and intercellularly in both spongy and palisade tissue (Fig. 2). The infection could occur on either surface of the leaf. In the infected leaves there was alteration of the size of epidermis, palisade and spongy cells and also the number of plastids in them.



Figures 1-4:

Fig 1. Transverse section of leaf showing cystolith in upper epidermis and healthy mesophyll with palisade and spongy parenchyma cells ($\times 400$).

Fig 1. Coupe transversale de feuille montrant le cystolithe de l'épiderme supérieure ainsi que le mésophylle sain contenant des cellules palissadiques et à parenchyme spongieux ($\times 400$).

Fig 2. Ramifying hypha (H) and infected cells in mesophyll ($\times 400$).

Fig 2. Hyphe ramifiante (H) et cellules infectées dans le mésophylle ($\times 400$).

Fig 3. Rust infected mesophyll with hypertrophied palisade, spongy cells, mycelium and peridial wall of uredinium with urediniospores ($\times 400$).

Fig 3. Mésophylle infecté de rouille avec des cellules palissadiques spongieuses hypertrophiées, le mycélium et la paroi pérédiale de l'urédinium avec des urédiniospores ($\times 400$).

Fig 4. Rust infected mesophyll and ruptured urediniosorus with peridium and well developed sub sessile urediniospores ($\times 400$).

Fig 4. Mésophylle infecté de rouille et urédiniospore déchirée avec pérédium et urédiniospores sub sessiles bien développées ($\times 400$).

In healthy mulberry leaves the chlorophyll content declines gradually with age and senescence. But in rust infected leaf, rapid loss of chlorophyll occurred as the infection progressed. The loss of chlorophyll was highest in leaves with higher pustule density and leaves turned yellow, papery and withered off much earlier than the healthy ones. At the flecking stage, the concentration of chlorophyll both within and between the pustules was lower than in the healthy leaves. At sporulation stage, the chlorophyll declined to a much greater extent. Approximately 20% of total area of pustule was occupied by sporulating centre. The quantity of carotenoids within the pustule appeared to be greater than in uninfected regions of leaf.

Histochemical changes:

Insoluble polysaccharides :

The healthy palisade and spongy parenchyma cells (Fig. 1) of mulberry leaf were rich in carbohydrates and hence stained dark magenta colour with PAS. With the onset of infection that is penetration and spread of mycelium in upper epidermis and palisade tissue, there was colour change from magenta to brick red. As the fungal development progressed the cells adjacent to infected palisade and spongy cells lost their stainability with PAS. But the hypertrophied palisade and spongy cells with mycelium of rust (Fig. 2), stained deep magenta colour with PAS, indicating the rich presence of polysaccharides. As the infection progressed towards the lower epidermis most of the infected palisade and spongy parenchyma cells along with their adjacent cells lost their normal shape and stainability for PAS. Further there was decrease in size of mesophyll cells and disintegration of cell borders at post infection stages. Deep staining with PAS was observed at the site of formation of urediniosporus, indicating the presence of polysaccharide. The developing urediniospores were greenish to brick red in colour, but the well developed urediniospores stained deep red to dark magenta colour with PAS indicating that the mature spores are rich in polysaccharide, which could be used during their germination.

Starch:

The healthy palisade and spongy parenchyma cells of mulberry leaf were rich in starch and hence stained bluish black uniformly with Iodine - potassium iodide solution. As the infection of rust progressed, the starch content in the host cells got depleted. It was also observed that the starch was found accumulated in hypertrophied mesophyll cells of leaf. An interesting feature observed was that there was no accumulation of starch near or in the urediniospores (Fig. 3).

Proteins:

The healthy palisade and spongy parenchyma cells of mulberry leaf, were rich in proteins and hence stained blue colour uniformly with mercuric - bromophenol blue i. e., M. B. B. With the onset of infection that is penetration and spread of mycelium / hyphae (Fig. 2) in and between palisade and spongy tissue it was observed that, the presence of proteins were diffused in the infected cells. But in the spongy parenchyma cells, the proteinoplastids still retained their shape as distortion was very little in the initial stage of infection. The developing hyphae and spores stained blue with M. B. B. indicating the presence of proteins in them. The well developed hyphae and hypertrophied cells of mesophyll stained pale blue with yellow tinge indicating the presence of protein but with little quantity. But the well developed urediniospores stained deep blue with MBB indicating the presence of proteins.

Nucleic acids:

The healthy palisade and spongy parenchyma cells of mulberry leaf are rich in nucleic acids, hence stained blue green to purplish green with Toluidine blue. The rust infected epidermal cells stained blue to purple showing rich RNA content. The giant hypertrophied cells of mesophyll stained deep blue to purplish green indicating the presence of both RNA and DNA. The cells of the mesophyll neighbouring to hypertrophied cells stained pale blue to green with Toluidine blue indicating the

presence of RNA and DNA but to a very little extent. The hyphae and well developed urediniospores (Fig. 4) stained deep blue to purplish green indicating the richness in nucleic acids. It was observed that in the hypertrophied cells of rust infected mulberry mesophyll cells which stained deep purplish red by methyl green - pyronin indicated the rich presence of RNA. As the disease was severe the neighbouring host cells of hypertrophied cells lost their capacity to stain with MGP by a clear indication that RNA and other cell metabolites have accumulated in hypertrophied cells indicating the presence of pathogen with peak metabolic activity. The urediniospores were also stained deep purplish red with MGP indicating the richness of RNA in them.

DISCUSSION

The chloroplasts became smaller in infected cells than in the healthy mesophyll cells of mulberry and degenerated gradually leading to loss of chlorophyll from infected cells. A similar type of observation was made by Allen (1923) in wheat infected by *Puccinia graminis tritici* Pers (Eriks. & P. Henn. Sziraki *et al.*, 1984) suggested that in rust infected bean leaves, the net synthesis of chlorophyll at infection sites occurred during early disease development, so that the concentration was higher than in uninfected leaves and it resulted in green island stage.

In the present study it was observed that, at high pustule densities the major loss of chlorophyll occurred from regions between pustules and then gradually in pustules at flecking stage. Doodson *et al.* (1965), Calonge (1967) and Mitchell (1979) were of the opinion that rust infection leads to reduction in chlorophyll content of infected leaves. Kiraly *et al.* (1967) and Sziraki *et al.* (1978) showed that rust disease caused increase of cytokinin concentration, thus implicating the formation of green islands in rust infected leaves. Padma (1989) studied the effect of rust infection on chlorophyll content of mulberry and stated that 43% of total chlorophyll content was reduced due to rust infection.

Earlier experiments lead to the assumption that growth regulators, especially of the auxin type might be involved in the interactions during the ontogeny of the host - parasite complex (Antonelli and Daly, 1966 ; Shaw and Hawkins, 1958). The development of infection structures has been correlated by Dunkle *et al.* (1969), Kim and Rohringer (1974), Ramakrishnan and Staples (1970), Staples (1974) and Staples *et al.* (1975) with the activation of protein, RNA and DNA synthesis.

In healthy mulberry leaf tissue the chloroplasts were rich in protein, hence stained deep blue with MBB. As the disease progressed, the outline of proteinoplastids got distorted and finally the proteins got diffused with the disintegration of plastids. This phenomenon was more pronounced in palisade cells than in spongy cells. By the entry of pathogen into host cells the degeneration of proteins was initiated. Wang (1980) reported lower nutritive value of rust infected leaves of mulberry.

Sundareswaran *et al.* (1988) have reported significant reduction in crude protein, reducing sugar and total sugars in rust infected mulberry leaves compared to healthy leaves. Umesh Kumar (1991) in his studies on biochemical changes in mulberry leaves infected by foliar pathogens, stated that the soluble proteins, amino acids and sugars showed both increase and decrease.

The rust fungus prefers carbohydrate for its growth and development and hence any change in the nitrogen carbohydrate ratio in the host plant has created an apparent resistance to the pathogen. Chong *et al.* (1981) observed that extrahaustorial matrix contained stainable polysaccharides and proteins.

The accumulation of starch in chloroplasts of rust invaded hypertrophied palisade and spongy cells of mulberry is due to the hindrance of amylase activity by pathogen. Wang (1961) suggested that the accumulation of starch in chloroplasts of rust infected bean leaves was due to *de novo* synthesis at infected areas and it can be related to increased concentration of cytokinin which influenced the deposition of starch.

In the present study it was observed that in the rust infected mulberry leaves, the area of accumulation of starch corresponds to the mycelial zone of the pustule. Starch accumulation continued in the chloroplast of infected host cells until sporulation began. With sporulation the loss of starch

occurred around the pustules and by the end of sporulation, starch had completely disappeared. It is probable that starch has been hydrolysed into reducing sugars by pathogen during sporulation and has been utilized for development of urediniospores.

Sziraki *et al.* (1984) observed the disappearance of starch in chloroplast during sporulation of mildew and rust infected Pinto bean leaves. According to Mac Donald and Strobel (1970) and Whipps and Lewis (1981) the leaves infected with many biotrophic pathogens accumulated chloroplastic starch, but the pattern and extent of starch accumulation is controversial (Bushnell and Allen, 1962).

The rust fungus inhibits photosynthesis and it competes for photosynthate leading to accumulation of starch around the infected area. In mulberry leaf the rust infected mesophyll cells including hypertrophied cells stained deep blue to purplish green with Toluidine blue, indicating the presence of both RNA and DNA in larger quantity, but the neighbouring mesophyll cells of hypertrophied cells stained pale blue to green indicating the presence of RNA and DNA in less quantity.

CONCLUSION

The effect of rust disease on biochemical and physiological changes through histochemical changes helps in deciding the nutritional status of leaves. The pathogen alters the histochemistry of host mesophyll and in turn alters the biochemistry and physiology of the host. The photosynthetic rate is also adversely affected due to denaturing of chloroplasts. On the whole, the healthy mulberry leaf mesophyll cells are rich in carbohydrates, starch, proteins and nucleic acids. The metabolites present in the leaf are utilized for the development and sporulation of the rust fungus. The well developed urediniospores of mulberry rust are rich in carbohydrates, proteins and nucleic acids.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank S. Joshi, Professor of Botany, University of Agricultural Sciences Bangalore for help in histochemical work. The authors thank the Director, Divisional Chief (Moriculture) and Scientific officer I (Plant protection) of Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore for facilities.

KVP thanks John Lacey and Maureen E. Lacey of Rothamsted experimental station, Harpenden, Herts, England for providing literature and valuable suggestions.

REFERENCES

- ALLEN R. F. (1923) A cytological study of infection of Baart and Kanred wheats by *Puccinia graminis tritici*. Journal of Agricultural Research, 23, 131 - 151.
- ANTONELLI E., DALY J. M. (1966) Decarboxylation of I.A.A. by near isogenic lines of wheat resistant or susceptible to *Puccinia graminis f. sp. tritici*. Phytopathology, 56, 610 - 618.
- BARCLAY A. (1890) Descriptive list of Uredineae occurring in the neighbourhood of Simla (Western Himalayas). III. Journal of Asiatic Society, Bengal, 59, pp 75 - 112.
- BARCLAY A. (1891) Additional Uredineae from the neighbourhood of Simla. III. Journal of Asiatic Society, Bengal, 60, pp 211 - 230.
- BUSHNELL W. R., ALLEN P. J. (1962) Induction for disease symptoms in barley infected by Powdery mildew. Plant Physiology, 37, 50 - 59.
- CALONGE F. D. (1967) Chlorophyll and total nitrogen in barley rust infection. Transactions of the British Mycological Society, 50, 397 - 401.
- CHONG J., HARDER D. E., ROHRINGER R. (1981) Ontogeny of mono and dikaryotic rust haustoria. Cytochemical and ultra structural studies. Phytopathology, 71, 975 - 983.
- DOODSON J. K., MANNERS J. G., MYERS A. (1965) Some effects of yellowrust (*Puccinia striiformis*) with 14 Carbon assimilation and translocation in wheat. Journal of Experimental Biology, 16, 304 - 317.

- DUNKLE L. D., MAHESHWARI R., ALLEN P. J. (1969) Infection structures from rust uredospores. Effect of RNA and Protein synthesis inhibitors. *Science* (Washington), 163, 481 - 482.
- FEDER O., O' BRIEN T. P. O. (1968) Special paper on plant microtechnique, some principles & new methods. *American Journal of Botany*, 55 (1), 123 - 142.
- HOTCHKISS R. D. (1948) Microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Archives Biochemistry*, 16, 131 - 141.
- JENSEN W. A. (1962) Botanical histochemistry. Principles and practice. Sanfransisco. W. H. Freeman and Co., pp 1 - 408.
- JOHANSEN D. A. (1940) Plant microtechnique, New York. Mc Graw - Hill. pp 1 - 523.
- KIM W. K., ROHRINGER R. (1974) Ribonucleic acids of differentiating and nondifferentiating uredosporelings of wheat stem rust. *Canadian Journal of Botany*, 52, 1309 - 1317.
- KIRALY Z., HAMMADY E. L. M., POZSAR B. I. (1967) Increased cytokinin activity of rust infected bean leaves and broad bean leaves. *Phytopathology*, 57, 93 - 94.
- Mac DONALD P. W., STROBEL G. A. (1970) Adenosine diphosphate - glucose phosphorylase control of starch accumulation in rust infected wheat leaves. *Phytopathology*, 10, 257 - 274.
- MAZIA D., BREWER P. A., ALFERT M. (1953) The cytochemical staining and measurement of proteins with mercuric bromophenol blue. *Biological Bulletin*, 104, 57 - 67.
- MITCHELL D. T. (1979) Carbon dioxide exchange by infected first leaves susceptible to wheat stem rust. *Transactions of the British Mycological Society*, 72, 63 - 68.
- PADMA S. D. (1989) Studies on physiology of some fungal pathogens of mulberry, Ph. D. Thesis, Bangalore University.
- PATEL M. K., KAMAT M. N. and BHIDE V. P. (1949) Fungi of Bombay, Supplement I. *Indian Phytopathology*, 2, pp 142 - 145.
- PRASAD K. V., DAYAKAR YADAV B. R., SULLIA S. B. (1993) Taxonomic status of rust on mulberry in India. *Current Science*, 65 (5), 424 - 425.
- RAMAKRISHNAN L., STAPLES R. C. (1970) Changes in Ribonucleic acid during uredospores differentiation. *Phytopathology*, 60, 1087 - 1091.
- RANGASWAMY G., NARASIMHANNA M. N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C. A., JOLLY S. (1976) Manual on Sericulture Vol. I. Mulberry Cultivation. Food agriculture organisation Rome. pp 1 - 150.
- SHAW M., HAWKINS A. R. (1958) The physiology of host parasite relations. V. A preliminary examination of the level of free endogenous Indoleacetic acid in rusted and mildewed cereal leaves and their ability to decarboxylase exogenously supplied Indoleacetic acid. *Canadian Journal of Botany*, 36, 1 - 16.
- STAPLES R. C. (1974) Synthesis of DNA during differentiation of bean rust uredospores. *Physiological Plant Pathology*, 4, 415 - 424.
- STAPLES R. C., APP A. A., RICCI P. (1975) DNA synthesis and nuclear division during formation of infection structures by bean rust uredospore germings. *Archives of Microbiology*, 104, 123 - 127.
- SUNDARESWARAN P., GOVINDAIAH, SRINIVASAN E. B., JOLLY M. S. (1988) Effect of leaf rust disease on the nutritive composition of mulberry (*Morus alba* L.) *Indian Journal of Sericulture*, 27, 159 - 160.
- SZIRAKI I. B., BARNA B., EL WAZIRI S., KIRALY Z. (1978) Effect of rust infection on cytokinin level of wheat cultivars susceptible and resistant to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Acta Phytopathologia* (Academy of Sciences, Hungary), 11, 155 - 160.
- SZIRAKI I. B., MUSTARDY L. A., FALUDI - DANIEL A., KIRALY Z. (1984) Alterations in chloroplast ultrastructure and chlrophyll content in the rust infected pinto beans at different stages of disease development. *Phytopathology*, 74, 77 - 84.
- UMESH KUMAR N. N. (1991) Physiological studies of the mulberry varieties infected by foliar pathogens. Ph. D. Thesis. Bangalore University.
- WANG D. (1961) The nature of starch accumulation of the rust infection site in leaves of pinto bean plants. *Canadian Journal of Botany*, 39, 1595 - 1604.
- WANG H. (1980) *National Scientific Council Mon* 8, 604 - 615.

WHIPPS J. M., LEWIS D. H. (1981) Patterns of translocation, storage and interconversion of carbohydrates. Effects of disease on the physiology of growing plants. (ed. P. G. Ayres), Cambridge, U. K. : Cambridge University press. pp 47 - 83.

HISTOCHIMIE DE LA FEUILLE DE MURIER INFECTÉE PAR LA ROUILLE

K. V. PRASAD, B. R. DAYAKAR YADAV* & S. B. SULLIA**

Karnataka State Sericultural Research and Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore, 560 062, Inde.

Le champignon de la rouille *Peridiopsora mori* Barclay (Prasad et coll.), un biotrophe du mûrier (*Morus alba* L.) est épidémique d'août à février chaque année. Il cause de sérieux dégâts au feuillage, sous l'aspect de pustules d'un brun rougeâtre de septembre à janvier. Le tissu infecté du mésophylle indique un épuisement des polysaccharides insolubles, des protéines de l'ARN et de l'ADN. Les changements histochimiques de la feuille infectée sont accompagnés d'une réduction de l'épaisseur de la feuille, de la taille des cellules épidermiques et du nombre de chloroplastes et de protéoplastes. Les hyphes inter et intracellulaire, les cellules du mésophylle hypertrophiées et l'urédinie qui se développe, comprenant les urédiniospores enserrés par le péridium montrent la présence de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. Le tissu normal du mésophylle indique une accumulation moindre de ces composants avec un transfert des substances aux tissus infectés et aux structures fongiques qui se développent. La quantité de caroténoïdes à l'intérieur de la pustule est plus importante que celle des portions non - infectées de la feuille.

INTRODUCTION

Le mûrier (*Morus alba* L.) est cultivé pour son feuillage, qui représente la seule nourriture des vers à soie (*Bombyx mori* L.). Le mûrier est prédisposé à de nombreuses maladies causées par des champignons, dont les plus importants sont la tache de la feuille, le mildiou poudreux et la rouille de la feuille. L'examen de la littérature à ce sujet indique que le champignon de la rouille sur le mûrier est connu des scientifiques indiens en tant qu'*Aecidium mori* Barclay (Barclay 1891, Rangaswamy et coll., 1976), ou comme *Cerotelium fici* (Cast) Arthur (Patel et coll., 1949). Barclay lui-même a identifié la rouille comme *Caeoma mori* (Barclay, 1890) et l'a ensuite renommée *Aecidium mori* (Barclay) Syd. & Butler. Mais le champignon de la rouille le plus répandu sur le mûrier en Inde n'est pas conforme avec les concepts génériques de *Aecidium* ou de *Cerotelium*, à cause de l'absence des stades aecial et telial. La rouille est prédominante uniquement à son stade anamorphique. Les feuilles de mûrier infectées par le champignon de la rouille expriment des cloques qui ressemblent à des pustules avec seulement l'urédinium et l'ostiole, par laquelle sortent des amas de spores crémeuses. L'urédinium de la rouille du mûrier contenait un péridium cellulaire enserré d'urédiniospores sessiles à non - sessiles, subglobuleux à pyriforme et echinulé à verruqueux. Les urédiniospores contenaient quatre pores à germes. Ces caractéristiques confirment l'identité du champignon de la rouille de la feuille comme *Peridiopsora mori* Barclay (Prasad et coll., 1993). La rouille est à son maximum d'intensité entre août et février de chaque année. Le champignon de la rouille du mûrier a besoin d'une

* Central Silk Board, Bangalore 560 068, Inde.

** Department of Microbiology, Bangalore University, Jnana Bharathi Campus, Bangalore, 560 056, Inde.
(Auteur auquel la correspondance doit être adressée).

humidité relativement élevée (au-dessus de 60 % RH) et d'une température modérée (20 - 26° C) pour se développer rapidement.

La feuille de mûrier infectée par le champignon de la rouille est hétérogène i.e., elle contient aussi bien des tissus infectés que non-infectés et les proportions relatives à ces deux types de tissus, changent selon la progression de l'infection. L'hétérogénéité est le résultat de changements se déroulant à l'intérieur de chaque pustule. L'interprétation des processus physiologiques dans les feuilles infectées de rouille nécessite une connaissance précise de la localisation et du développement du germe pathogène à l'intérieur de la feuille en relation à la fois avec les symptômes visibles sur la feuille et les autres changements métaboliques à l'intérieur de la feuille e.g., l'accumulation d'hydrates de carbone solubles et insolubles, de protéines, d'acides nucléiques etc. Des études histochimiques ont été entreprises afin d'étudier l'interaction entre l'hôte et le germe pathogène selon le point de vue mentionné plus haut, afin d'étudier l'accumulation des photosynthétats et des autres métabolites.

MATERIELS ET METHODES

Afin d'étudier l'histochimie des feuilles de mûrier saines et de celles infectées par la rouille, des échantillons de feuilles de 1,0 × 0,5 cm de *Morus alba* L. var. M-5 ont été recueillies et fixées dans un liquide FAA et Carnoy B. La déshydratation du matériel fixé a été obtenue à l'aide de séries d'éthanol et de n-butanol. L'inclusion du matériel traité a été faite avec de la paraffine fondue à 58 - 60° C. La coupe du matériel à 7µm d'épaisseur fut réalisée à l'aide d'un microtome rotatif ERMA et les coupes ont été fixées sur des lames en utilisant 1 % de gélatine et 0.2 % d'une solution à 2 % de bichromate de potassium. Les coupes ont été déparaffinées avec du xylène, hydratées et assujetties à la coloration histochimique afin de localiser les polysaccharides insolubles, les protéines et les acides nucléiques.

La localisation et l'évaluation des polysaccharides insolubles totaux ont été réalisées en utilisant le test Acide périodique - Schiff's (PAS - Hotchkiss, 1948). Les coupes hydratées ont été placées dans de l'acide périodique à 4 % pendant 25 minutes. Elles ont été rincées soigneusement dans de l'eau courante. Ensuite, elles ont été colorées dans l'agent réactif de Schiff pendant 15 min à température ambiante et rincées dans une eau à 40 - 45° C pendant 5 min.

La localisation et l'évaluation de l'amidon ont été réalisées en employant le test à l'iode - potassium (Johansen, 1940). Les coupes hydratées ont été introduites dans une solution d'iode pendant 10 - 15 minutes. Ensuite, les coupes ont été rincées et montées dans de l'eau.

La localisation et l'évaluation des sites contenant des protéines insolubles ont été réalisées en utilisant la méthode de coloration au bleu de mercure - bromophénol (M. B. B. - Mazia et coll., 1953). Les sections déparaffinées après un revêtement à la celloïdine (0.3 %), puis un séchage à l'air ont été colorées au bleu de mercure - bromophénol pendant 10 min. Les coupes ont été immergées dans une eau légèrement acide puis agitées vigoureusement afin que la couleur se développe.

La localisation et l'évaluation des sites contenant des acides nucléiques ont été réalisées en utilisant : (a) la méthode de coloration au bleu de Toluidine (T. B. - Feder et O'Brien, 1968)

(b) la méthode de coloration au pyronine - vert de méthyle (M. G. P. - Jensen, 1962).

Le bleu de Toluidine est une coloration métachromatique qui colore à la fois l'ARN et l'ADN d'un contraste évident. Les coupes hydratées ont été colorées dans une solution au bleu de Toluidine à 0.1 % pendant 3 - 4 min. Puis elles ont été rincées dans de l'eau en les agitant vigoureusement jusqu'à ce qu'elles soient exemptes d'un surplus de coloration. Les coupes hydratées ont été colorées dans une solution de pyronine - vert de méthyle pendant 30 min, puis les coupes colorées furent rincées vigoureusement à l'eau afin de supprimer le surplus de coloration. Les coupes colorées furent déshydratées en les passant dans de l'éthanol - n-butanol, nettoyées au xylène et montées sur D. P. X.

RESULTATS

Le tissu du mésophylle des feuilles de mûrier infectées de rouille montre la présence intra et intercellulaire de mycélium à la fois dans les tissus spongieux et palissadiques (Fig. 2). L'infection peut se déclarer sur l'une ou l'autre surface de la feuille. Les feuilles infectées montrent une altération de la taille de l'épiderme, des cellules spongieuses et palissadiques ainsi que du nombre de plastides qu'elles contiennent.

Les feuilles de mûrier saines ont une teneur en chlorophylle qui diminue graduellement avec l'âge et la sénescence. Par contre, les feuilles infectées perdent rapidement leur teneur en chlorophylle au fur et à mesure que l'infection progresse. La perte de la chlorophylle était plus importante dans les feuilles qui avaient une densité de pustules plus importante et les feuilles devinrent jaunes, semblables à du papier et se fanèrent beaucoup plus tôt que les feuilles saines. Au stade des mouchetures, la concentration de chlorophylle à la fois à l'intérieur et entre les pustules était moins importante que chez les feuilles saines. Au stade de la sporulation, la chlorophylle diminua à un degré beaucoup plus important. Approximativement, 20 % de la surface totale des pustules était occupée par un centre de sporulation. La quantité de caroténoïdes à l'intérieur de la pustule semble être plus importante que celle des parties non infectées de la feuille.

Changements histochimiques :

Les polysaccharides insolubles :

Les cellules palissadiques et du parenchyme spongieux (Fig. 1) de la feuille de mûrier sont riches en hydrates de carbone et en conséquence, se colorent d'un magenta sombre avec le PAS. Lors du début de l'infection, c'est à dire au moment de la pénétration et de la diffusion du mycélium dans l'épiderme supérieur et dans le tissu palissadique, la coloration change du magenta au rouge brique. Pendant que le développement fongique progresse vers l'épiderme inférieur, la plupart des cellules palissadiques et du parenchyme spongieux infectées, ainsi que leur cellules adjacentes, perdent leur forme normale et leur capacité à se colorer avec le PAS. En outre, les cellules du mésophylle diminuent en taille et les cellules périphériques se désintègrent pendant les stades post - infection. Une forte coloration avec le PAS fut observée au moment de la formation de l'urédiniospore, indiquant la présence de polysaccharides. Les urédiniospores en formation se colorent du verdâtre au rouge brique, mais les urédiniospores bien développés se colorent d'un rouge intense à un magenta sombre avec le PAS, ce qui indique que les spores mûres sont riches en polysaccharides qui pourraient être utilisés pendant la germination.

Amidon :

Les cellules saines palissadiques et du parenchyme spongieux des feuilles de mûrier sont riches en amidon et en conséquence, se colorent uniformément d'un noir bleuâtre dans une solution d'iode - potassium. Pendant que l'infection de la rouille progresse, la teneur en amidon des cellules hôtes s'épuise. Il a également été observé que l'amidon s'accumulait dans les cellules hypertrophiées du mésophylle de la feuille. Une caractéristique intéressante qui fut observée, fut l'absence d'accumulation d'amidon près de ou dans les urédiniospores (Fig. 3).

Protéines :

Les cellules saines palissadiques et du parenchyme spongieux de la feuille du mûrier sont riches en protéines et en conséquence, se colorent d'un bleu uniforme avec le bleu de mercure - bromophénol i.e. M. B. B. Avec la première attaque de la maladie, autrement dit lors de la pénétration et du développement du mycélium / de l'hyphe (Fig. 2) à l'intérieur et entre les tissus palissadiques et spongieux, il a été observé que la présence des protéines se diffusait dans les cellules infectées. Néanmoins, dans les cellules spongieuses du parenchyme, les protéoplastes maintiennent encore leur forme car leur déformation est plutôt minime lors des premiers stades de l'infection. L'hyphe en

formation ainsi que les spores se colorent en bleu avec M. B. B., ceci indiquant la présence de protéines. L'hyphe bien développée et les cellules hypertrophiées du mésophylle se colorent d'un bleu pâle avec des teintes de jaune indiquant la présence de protéines en petites quantités. Toutefois, les urédiniospores bien développées se colorent d'un bleu foncé avec le M. B. B., indiquant la présence de protéines.

Acides nucléiques :

Les cellules saines palissadiques et du parenchyme spongieux de la feuille de mûrier sont riches en acides nucléiques, en conséquence elles se colorent du bleu vert au violet vert avec le bleu de Toluidine. Les cellules de l'épiderme infectées par la rouille se colorent du bleu au violet indiquant une teneur importante en ARN. Les cellules géantes hypertrophiées du mésophylle se colorent du bleu foncé au violet vert indiquant à la fois la présence d'ARN et d'ADN. Les cellules du mésophylle adjacentes aux cellules hypertrophiées se colorent du bleu pâle au vert avec le bleu de Toluidine indiquant la présence d'ARN et d'ADN, mais en faible quantité. L'hyphe et les urédiniospores bien développées (Fig. 4) se colorent du bleu foncé au violet vert, indiquant l'abondance des acides nucléiques. Il a été observé que les cellules hypertrophiées des cellules du mésophylle du mûrier infectées par la rouille, se coloraient d'un violet rouge intense avec le méthyle vert - pyronine, indiquant l'abondance d'ARN. Lorsque la maladie est sévère les cellules hôtes adjacentes des cellules hypertrophiées perdent leur capacité à se colorer avec M. G. P., ceci étant une nette indication que l'ARN et les autres métabolites des cellules se sont accumulés dans les cellules hypertrophiées, ce qui indique une activité métabolique maximum du germe pathogène. Les urédiniospores se teintèrent également d'un violet rouge intense avec le M. G. P., indiquant l'abondance de la teneur en ARN.

DISCUSSION

Les chloroplastes devinrent plus petits dans les cellules infectées que dans les cellules saines du mésophylle du mûrier, puis dégénérèrent graduellement, aboutissant à une perte de la chlorophylle des cellules infectées. Un type d'observation similaire a été fait par Allen (1923) chez le blé infecté par *Puccinia graminis tritici* Pers (Eriks. & P. Henn. Sziraki et coll., 1984), qui suggéra que chez les feuilles de haricot infectées par la rouille, la synthèse nette de la chlorophylle aux endroits de l'infection se manifeste au début du développement de la maladie, de sorte que la concentration est plus importante que dans les feuilles non infectées et que ceci aboutit au stade de l'ilot vert.

Dans l'étude actuelle, il a été observé que, lors de densités importantes de pustules, la perte majeure de chlorophylle apparaît dans les portions entre les pustules puis, petit à petit dans les pustules, au stade des mouchetures. Doodson et coll. (1965), Calonge (1967) et Mitchell (1979) avancèrent que l'infection de la rouille conduit à une diminution de la teneur en chlorophylle des feuilles infectées. Kiraly et coll. (1967) et Sziraki et coll. (1978) établirent que la maladie de la rouille causait une augmentation de la concentration en cytokinine, ceci impliquant la formation d'ilots verts dans les feuilles infectées. Padma (1989) étudia les effets de l'infection de la rouille sur la teneur en chlorophylle du mûrier et affirma que 43 % de la teneur totale en chlorophylle était réduite à cause de l'infection par la rouille.

Des études antérieures nous ont amené à formuler l'hypothèse que, les régulateurs de croissance particulièrement ceux du type auxine pourraient être impliqués dans les interactions lors de l'ontogénie du complexe hôte - parasite (Antonelli et Daly, 1966 ; Shaw et Hawkins, 1958). Le développement des structures de l'infection a été mis en corrélation avec l'activation de protéines et la synthèse de l'ARN et de l'ADN.

Dans le tissu sain de la feuille de mûrier, le chloroplaste est riche en protéines, en conséquence il se colore en bleu avec le MBB. Alors que la maladie avance, le contour des protéoplastes se déforme et finalement les protéines diffusent avec la désintégration des plastides. Ce phénomène était plus prononcé dans les cellules palissadiques que dans les cellules spongieuses. C'est l'entrée du germe

pathogène dans les cellules hôtes qui est à l'origine de la dégénérescence en protéines. Wang (1980) signala une valeur nutritive moindre des feuilles de mûrier infectées.

Sundareswaran et coll. (1988) ont signalé une diminution significative des protéines brutes, ce qui réduit la teneur en sucre et en sucres totaux des feuilles de mûrier infectées par la rouille, comparées à des feuilles saines. Dans ses études sur les changements biochimiques des feuilles de mûrier infectées par des pathogènes foliaires, Umesh Kumar (1991) affirme que les protéines solubles, les acides aminés et les sucres marquèrent à la fois une augmentation et une diminution.

Le champignon de la rouille préfère les hydrates de carbone pour sa croissance et son développement et en conséquence, tout changement du ratio d'hydrates de carbone / azote dans la plante hôte, suscite une apparente résistance au germe pathogène. Chong et coll. (1981) ont observé que la matrice extrahaustorium contenait des polysaccharides et des protéines colorables.

L'accumulation d'amidon dans les chloroplastes des cellules palissadiques et spongieuses hypertrophiées du mûrier envahies par la rouille est due à l'empêchement de l'activité amylase par le germe pathogène. Wang (1961) suggéra que l'accumulation d'amidon dans les chloroplastes de feuilles de haricot infectées de rouille, était due à la synthèse *de novo* au niveau des zones infectées et que ceci pouvait être mis en relation avec la concentration accrue de cytokinine, ce qui influence le dépôt d'amidon.

Dans l'étude présente, il a été observé que dans les feuilles de mûrier infectées par la rouille, la zone où l'amidon est accumulé correspond à la zone mycéliale de la pustule. L'accumulation de l'amidon se poursuit dans le chloroplaste des cellules hôtes infectées jusqu'à ce que commence la sporulation. Avec la sporulation, la perte d'amidon se déclare autour des pustules et, à la fin de la sporulation, l'amidon a complètement disparu. Il est probable que l'amidon ait été hydrolysé en sucres réduits par le germe pathogène pendant la sporulation et ait été utilisé pour le développement des urédiniospores.

Sziraki et coll. (1984) ont observé la disparition de l'amidon dans le chloroplaste pendant la sporulation du mildiou et des feuilles de haricot Pinto infectées par la rouille. Selon Mac Donald et Strobel (1970) et Whipps et Lewis (1981), les feuilles atteintes de plusieurs pathogènes biotrophiques accumulèrent de l'amidon chloroplastique, mais le diagramme et l'étendue de l'accumulation d'amidon est controversable (Bushnell et Allen, 1962).

Le champignon de la rouille inhibe la photosynthèse et il fait la concurrence pour la photosynthèse ce qui aboutit à une accumulation d'amidon autour de la zone infectée. Dans la feuille de mûrier, les cellules du mésophylle infecté par la rouille ainsi que les cellules hypertrophiées se colorèrent du bleu foncé au vert violet avec le bleu de Toluidine, ce qui indique la présence à la fois de l'ARN et de l'ADN en quantités importantes, mais les cellules adjacentes du mésophylle se colorèrent du bleu pâle au vert, ce qui indique la présence de l'ARN et de l'ADN en quantité moindre.

CONCLUSION

L'effet de la maladie de la rouille sur les changements physiologiques et biochimiques par le moyen des changements histochimiques aide à se prononcer sur le statut nutritionnel des feuilles. Le germe pathogène altère l'histochimie du mésophylle de l'hôte et altère à son tour la biochimie et la physiologie de l'hôte. Le taux de photosynthèse est également défavorablement affecté en raison de la dénaturation des chloroplastes. Dans l'ensemble, les cellules saines du mésophylle de la feuille de mûrier sont riches en hydrates de carbone, en amidon, en protéines et en acides nucléiques. Les métabolites présents dans la feuille sont utilisés pour le développement et la sporulation du champignon de la rouille. Les urédiniospores bien développées de la rouille du mûrier sont riches en hydrates de carbone, en protéines et en acides nucléiques.

ENHANCED EFFICACY OF FUNGICIDES USING STICKER IN FOLIAR MULBERRY DISEASE CONTROL

P.M. PRATHEESH KUMAR, S.M.H. QADRI, S.K. GANGWAR & B. SARATCHANDRA

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, India.

Enhancement in the efficacy of fungicides has been studied against two leaf spot diseases and sooty mould by the addition of 0.06% Triton - AE, a commercial sticker containing 37.5% resin of esters alongwith the recommended fungicides. Among five numbers of fungicides viz. Bixetanol, Triadimefon, Carbendazim, Mancozeb and Copper Oxychloride tested, Carbendazim found effective for the control of leaf spot diseases and sooty mould. Addition of Triton - AE alongwith the fungicides enhanced its efficacy. This enhancement in efficacy was higher in case of Carbendazim (38.38) and lower (11.79) in case of Triademifon.

Keywords: Leaf spot diseases, sooty mould, fungicides, sticker.

INTRODUCTION

A variety of chemicals are used for the disease control in mulberry. They differ in their efficiencies in control of a given disease by virtue of their constituent ingredients basically. Besides this, other factors such as their concentration, time of application, weather conditions, proper distribution and persistence of spray solution on the surface of the plant parts are equally important in getting effective result of a fungicide and also for developing spray schedules (Thind and Jhooty, 1982). It has been observed that many times a sudden spell of rain washes out or dilutes the fungicide sprayed on the crop leading to failure of fungicide in the control of targeted disease as expected and cause a complete lapse of economic and the labour input incurred on plant protection operation besides crop loss due to the disease. Efforts were therefore made to overcome this problem and during early seventies, it has been reported that certain oils increase penetration of systemic fungicides in plants resulting in their greater efficacy for control of diseases like *Cercospora* leaf spot of peanut (Chatrath, 1993). Subsequently, commercial stickers have been put on use in important horticultural crops like grapes, onions etc. Triton (AE) is one such sticker containing 37.5% resin of esters which is suggested to be used alongwith pesticides to increase their tenacity and effectiveness. The exploitation of sticker however has not yet been made in mulberry disease control.

West Bengal is one of the high rainfall region which receives about 2000 mm rainfall annually. The mulberry crop raised in this region suffers due to leaf spot caused by *Cercospora moricola*, leaf spot caused by *Pseudocercospora mori* and sooty mould caused by a fungal growth consisting of *Chaetothyrium* and *Curvularia* on the leaf surface. These results in a substantial crop loss both qualitatively and quantitatively. Though chemical control measures are in practise, the sudden spell of rain leading to dilution and wash out of fungicide by rain water is found to be a serious problem for the control of these diseases.

In view of the above, an experiment with different fungicides was conducted at C. S. R. & T. I., Berhampore, during the rainy season (July - August, 1995) alongwith Triton - AE, an agricultural sticker to study its role in improving the efficacy of certain fungicides in mulberry disease control.

Table I. Effect of fungicides and their combinations with sticker

Tableau I. Effet des fongicides et de leurs associations avec le mouillant

Fungicides	Dose (%)	Leaf spot (<i>C. moricola</i>)		Leaf spot (<i>P. mori</i>)		Sooty mould	
		PDI	PDC	PDI	PDC	PDI	PDC
<i>Fongicides</i>		<i>Tache de la feuille (C. moricola)</i>		<i>Tache de la feuille (P. mori)</i>		<i>Moisissure noire</i>	
		PDI	PDC	PDI	PDC	PDI	PDC
Bitertanol	0.05	12.71	59.35	32.74	33.13	20.11	32.80
Bitertanol + Sticker / Label	0.05	7.68	75.44	29.45	39.85	16.52	44.80
Triadimefon	0.05	9.49	69.65	27.13	44.58	24.68	17.54
Triadimefon + Sticker / Label	0.05	6.28	79.91	22.97	53.08	24.81	17.10
Carbendazim	0.075	5.01	83.97	23.32	52.36	17.78	40.59
Carbendazim + Sticker / Label	0.075	3.32	89.38	17.46	64.34	7.64	74.47
Mancozeb	0.2	6.86	78.06	25.06	48.81	11.31	62.22
Mancozeb + Sticker / Label	0.2	6.47	79.30	21.65	55.78	8.91	70.23
Copper Oxychloride	0.2	6.58	78.95	29.59	39.56	13.07	56.33
Oxychlorure de cuivre							
Copper Oxychloride + Oxychlorure de cuivre + Sticker / Label	0.2	5.03	83.91	20.76	57.59	9.72	67.52
Control / Témoin		31.27		48.96		29.93	
CD at 5%		4.80		3.85		4.23	

PDI : Percent Disease Index / Index du pourcentage de maladie. **PDC** : Percent Disease Control / Pourcentage par rapport aux témoins.

MATERIALS AND METHODS

Mulberry variety S1 was planted in earthen pots (height 25 × dia. 30 cm). After complete establishment, the plants were treated with recommended doses of selected fungicides, viz. Bitertanol, Triadimefon, Carbendazim, Mancozeb and Copper Oxy-chloride, effective against leaf spots and sooty mould mixed with 0.06% of Triton -AE. The experiment was replicated three times. Two control treatments were maintained one with each fungicide alone and the other with distilled water. Data on the incidence of the diseases were collected 30 days after the appearance of disease and Percentage Disease Index (PDI) was calculated using the standard procedure (Govindaiah *et al.*, 1989).

RESULTS AND DISCUSSION

The results (Table I) showed that all the fungicides used along with the sticker effectively controlled both the leaf spot diseases and sooty mould as compared to check. Fungicides combined with sticker were found to result in lower disease incidence than those of the fungicides alone. Carbendazim @ 0.075% alongwith 0.06% sticker was found significantly superior in this regard compared to other fungicide-sticker combinations studied. This combination resulted in 89.38% and 64.34% and 74.47% control in the case of *Cercospora* leaf spot, *Pseudocercospora* leaf spot disease and sooty mould respectively which were superior to efficiency of disease control by fungicide alone, the corresponding figures being 83.97%, 52.36% and 40.59% respectively. There was an overall significant improvement in the efficacy of all fungicides with the use of sticker irrespective of diseases (Table II).

Table II. Enhanced efficacy of fungicides through sticker

Tableau II. Augmentation de l'efficacité des fongicides avec le mouillant

Fungicides / Fongicides	Mean PDI / Moyenne du PDI		Enhanced efficacy (%) Augmentation de l'efficacité
	without sticker sans mouillant	with sticker avec mouillant	
Bitertanol	21.85	17.88	18.16
Triadimefon	20.43	18.02	11.79
Carbendazim	15.37	9.47	38.38
Mancozeb	14.40	12.34	14.36
Copper Oxychloride	16.41	11.83	27.90
Mean / Moyenne	17.69	13.90	
CD (P = 0.05)			
Fungicide / Fongicide	1.21		
Sticker / Label	0.77		
Interaction	1.72		

PDI : Percent Disease Index / *Index du pourcentage de maladie.*

This is because sticker application increased the adherence of fungicide on mulberry leaf surface thereby prolonged their residual action. Such an action has been reported in tomato by Thind and Jhooty (1982) and in many other crop plants (Nene and Thapliyal, 1979). The enhanced efficacy due to sticker in the present study, however, differed with the fungicide which ranged from 11.79% minimum in Triadimefon and maximum 38.38% in the case of Carbendazim, indicating that performance of fungicide can be further improved by sticker through its better retention capacity.

The above results thus, suggest that the use of stickers alongwith agrochemicals meant for foliar application like fungicides etc. can improve their efficacy and it can be exploited on a large scale in mulberry particularly during the rainy season.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1996) Annual Research and Administrative Report, Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore, West Bengal, India.
- CHATRATH H.S. (1993) Quarter century of systemic fungicides - current status and challenges ahead. *Indian Phytopath.* 46 (1), 3 - 15.
- GOVINDAIAH., SHARMA D.D., SENGUPTA K., GUNASHEKAR V., SURYANARAYANA N., MADHAVARAO Y R. (1989) Screening of mulberry varieties against major fungal diseases. *Indian J. Seric.* 28 (2), 207 - 213.
- NENE Y.L., THAPLIYAL P.N. (1979) Fungicides in plant disease control. Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi, pp 16.
- THIND T.S., Jhooty J.S. (1982) Persistence of fungitoxicity of dithane M - 45 on some tomato varieties. *Indian Phytopath.* 35 (4), 657 - 660

AUGMENTATION DE L'EFFICACITE DES FONGICIDES GRACE A L'UTILISATION D'UN MOUILLANT DANS LA LUTTE CONTRE LA MALADIE FOLIAIRE DU MURIER

P.M. PRATHEESH KUMAR, S.M.H. QADRI, S.K. GANGWAR & B. SARATCHANDRA

Central Sericultural Research and Training Institute, Berhampore - 742 101, West Bengal, Indc.

L'augmentation de l'efficacité des fongicides a été étudiée pour deux maladies de la tache de la feuille et de deux moisissures noires en additionnant aux fongicides recommandés, 0,06 % de Triton - AE, un mouillant que l'on trouve dans le commerce et qui contient 37,5 % de résine d'esters. Sur cinq fongicides testés, à savoir le Bitertanol, le Triadimefon, le Carbendazim, le Mancozeb et l'oxychlorure de cuivre, le carbendazim s'est montré efficace dans la lutte contre les maladies de la tache de la feuille et de la moisissure noire. L'ajout de Triton - AE aux fongicides augmente leur efficacité. Cette augmentation de l'efficacité est plus importante avec le Carbendazim (38,38) et moins importante (11,79) avec le Triademifon.

INTRODUCTION

Chez le mûrier, une variété de produits chimiques est utilisée dans la lutte contre les maladies. Ils diffèrent dans leur efficacité à traiter une maladie donnée en vertu essentiellement, de leurs ingrédients constitutifs. En outre, d'autres facteurs, comme leur concentration, leur temps d'application, ainsi que les conditions météorologiques, une distribution rationnelle et la persistance de la solution vaporisée sur les surfaces des différentes parties de la plante sont également importants pour obtenir un résultat efficace de la part d'un fongicide mais aussi pour le développement de plantings de pulvérisation (Thind and Jhooty, 1982). Il a plusieurs fois été observé qu'une chute soudaine de pluie dilue ou élimine complètement le fongicide vaporisé sur les cultures, ce qui a pour résultat l'échec du fongicide dans la lutte attendue contre une maladie ciblée. Ceci aboutit à une défaillance totale sur le plan économique, lorsque l'on prend en compte le travail fourni pour l'opération de protection des plantes, outre la perte de la récolte due à la maladie. Des efforts ont donc été fournis afin de maîtriser ce problème : au début des années 70 il a été rapporté que certaines huiles augmentaient la pénétration de fongicides systémiques sur les plantes et par voie de conséquence améliorait leur efficacité dans la lutte contre des maladies telles que la tache *Cercospora* de la feuille de l'arachide (Chatrath, 1993). Par conséquent, ces mouillants commerciaux ont été utilisés en horticulture sur des cultures importantes comme le raisin, les oignons etc. Le Triton (AE) est l'un de ces mouillants qui contient 37,5 % de résine d'esters et dont l'utilisation en commun avec des pesticides est suggérée, afin d'en augmenter la ténacité et l'efficacité. L'exploitation de ce mouillant n'est cependant pas étendue à la lutte contre la maladie du mûrier.

Le Bengale Ouest est l'une des régions à forte pluviosité qui reçoit environ 2000 mm de précipitations par an. La culture du mûrier dans cette région souffre de deux maladies de la tache de la feuille, causées par *Cercospora moricola* et *Pseudocercospora mori*, ainsi que d'une moisissure noire causée par une excroissance fongique composée de *Chaetothyrium* et de *Curvularia* sur la surface de la feuille. Ces maladies aboutissent à une perte substantielle des cultures à la fois sur le plan quantitatif et qualitatif. Bien que des mesures de lutte chimique soient mises en pratique, les

chutes de pluie, qui aboutissent à la dilution et à la disparition totale des fongicides sont un sérieux problème dans la lutte contre ces maladies.

En rapport avec ce qui est dit plus haut, une expérience sur différents fongicides a été menée à C. S. R. & T. I., Berhampore, pendant la saison des pluies (de juillet à août 1995), avec le Triton - AE, un mouillant agricole, afin d'étudier son rôle dans l'amélioration de l'efficacité de certains fongicides dans la lutte contre les maladies du mûrier.

MATERIELS ET METHODES

La variété de mûrier SI a été plantée dans des pots en terre cuite (H 25 cm × Ø 30 cm). Après établissement complet, les plantes ont été traitées avec les doses recommandées de fongicides sélectionnés, à savoir, du Bitertanol, du Triadimefon, du Carbendazim, du Mancozeb et de l'oxychlorure de cuivre, qui sont efficaces contre les taches des feuilles et la moisissure noire lorsqu'ils sont mélangés à 0,06 % de Triton - AE. L'expérience a été reproduite trois fois. Deux traitements témoins ont été maintenus, l'un avec chacun des fongicides seuls et l'autre avec de l'eau distillée. Les données sur l'incidence des maladies ont été recueillies 30 jours après l'apparition de la maladie et l'Indice de Pourcentage de Maladie (PDI) a été calculé en utilisant la procédure standard (Govindaiah et coll., 1989).

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats (Tableau I) montrent que tous les fongicides utilisés avec le mouillant participaient efficacement à la lutte contre les maladies des taches des feuilles et de la moisissure noire en comparaison avec les témoins. Il a été remarqué que l'utilisation de fongicides combinés au mouillant avait pour résultat une incidence moindre de la maladie par rapport à des fongicides utilisés seuls. De ce point de vue, le Carbendazim 0,075 % associé au mouillant dosé à 0,06 % s'est montré significativement supérieur, lorsqu'on le compare à d'autres combinaisons fongicides - mouillants étudiées. Contre la maladie de la tache de la feuille *Cercospora*, cette association donne 89,38 % d'efficacité, alors qu'elle est de 64,34 % contre la maladie de la tache de la feuille *Pseudocercospora* et 74,47 % contre la moisissure noire. Ces résultats indiquent une efficacité supérieure à celle obtenue lors de l'utilisation d'un fongicide seul, qui était de 83,97 % contre la maladie de la feuille *Cercospora*, 52,36 % contre la maladie de la tache de la feuille *Pseudocercospora* et 40,59 % contre la moisissure noire. Il y a une amélioration globale significative de l'efficacité de tous les fongicides utilisés avec le mouillant, quelles que soient les maladies traitées (Tableau II).

Ceci est dû au fait que le mouillant augmente l'adhérence des fongicides sur la surface de la feuille de mûrier et prolonge donc leur action résiduelle. Une telle action a été remarquée par Thind et Jhooty (1982) sur la tomate, ainsi que sur beaucoup d'autres cultures (Nene et Thapliyal, 1979). En ce qui concerne l'étude présente, l'augmentation de l'efficacité grâce au mouillant diffère cependant selon le fongicide utilisé ; avec le Triadimefon, l'efficacité est minimum (11,79 %) et maximum (38,38 %) avec le Carbendazim, ce qui indique que la performance des fongicides peut être améliorée davantage par le mouillant grâce à sa meilleure capacité de rétention.

Les résultats ci-dessus suggèrent que l'utilisation des mouillants en commun avec des produits agrochimiques destinés à l'application foliaire, tels que des fongicides etc., peut améliorer leur efficacité et qu'ils peuvent être utilisés à grande échelle sur le mûrier, particulièrement pendant la saison des pluies.

ANTAGONISTIC EFFECT OF *BACILLUS SUBTILIS* ON MULBERRY ROOT-ROT FUNGUS *FUSARIUM SOLANI*

T. PHILIP & D.D. SHARMA

Central Sericultural Research and Training Institute, Research Extension Centre,
Angamaly 683 572, Kerala, India.

Root-rot caused by *Fusarium solani* inflicts considerable damage to mulberry (*Morus alba* L.). The disease cause sudden leaf withering, defoliation and death of plants. The incidence in South India ranges from 3 to 55 %. Considering the necessity to reduce the use of chemical fungicides for ecological safety, biological control of the disease has been attempted. In the present study, seven isolates of *Bacillus subtilis* were screened against the fungus by agar plug and pot culture methods. Under *in vitro* studies, five isolates have produced inhibition zone ranging from 8 to 18.3 mm against the pathogen, while others were ineffective. Isolate No5 has produced maximum inhibition. In pot culture studies, this isolate has controlled the disease up to 68 % and was selected for further field evaluation.

INTRODUCTION

Root-rot disease of mulberry caused by *Fusarium solani* causes considerable damage to mulberry due to sudden leaf withering, defoliation and subsequent death of plants. The incidence of the disease in South India ranges from 3 to 55 %. Root dipping of saplings in 0.1 % Carbendazim, 50 % wettable powder solution for half an hour and dusting of planting pits with 3 - 4 g indofil M-45 was found providing about 95 % protection against the disease (Philip *et al.*, 1995). However, considering the necessity to reduce the use of chemical fungicides for ecological safety, biological control of the disease has been attempted. Several species and isolates of *Trichoderma* and *Bacillus subtilis* have been reported as effective biocontrol agents on a variety of crops against many soil borne pathogens (Papavizas and Lumsden, 1980 ; Bell *et al.* 1982 ; Weller, 1988). In the present study, seven isolates of *Bacillus subtilis* have been screened *in vitro* and the most effective ones among them *in vivo* under pot culture against mulberry root-rot pathogen, *F. solani*, during the period 1995-97.

MATERIALS AND METHODS

During survey conducted on the occurrence and incidence of root-rot disease in South India, soil samples were collected from different mulberry gardens and *Bacillus subtilis* was isolated by the soil dilution plate technique (Waksman, 1927). Few isolates of *B. subtilis* were also isolated from mulberry leaves. They were identified based on Bergey's manual of Determinative Bacteriology (Buchnan and Gibbson, 1974) and later confirmed from International Mycological Institute, U.K.

In vitro screening :

In vitro screening for the identification of effective isolate of *B. subtilis* was conducted by the agar plug method (Takahashi *et al.*, 1979). Spore suspension of *F. solani* in distilled water was mixed with Czepak dox Agar media and taken in 10 cm diameter Petriplates. At the centre of the plates, a 4 mm diameter plug of different isolates of *B. subtilis* obtained from a 36 hours old culture was kept.

The whole set was incubated at room temperature ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) for 5 days and then the inhibition zone formed around the plugs of *B. subtilis* was measured as clear distance between the periphery of plug and the growth of the pathogen on plate from three different directions.

In vivo (pot culture) studies :

Six months old S36 mulberry saplings were planted in earthen pots of 25 cm diameter containing about 2 kg sterilized soil. *F. Solani* was multiplied on sand maize meal media and inoculated at the rate of 5 g / kg soil. *B. subtilis* isolates 5, 6, and 7 grown on nutrient agar broth for 36 hours containing 5×10^6 cfu / ml was inoculated at the rate of 50 ml per replication. The treatments were as follows :

T1 = *F. solani* alone (control)

T2 = *F. solani* + *B. subtilis* Isolate N° : 5

T3 = *F. solani* + *B. subtilis* Isolate N° : 6

T4 = *F. solani* + *B. subtilis* Isolate N° : 7

Each treatment and control was replicated eight times. Data on root-rot incidence in control and treatments were recorded 60 days after treatment by carefully uprooting the plants. The root-rot severity was calculated following Gray and Achenbach (1996) with a numerical index of 1 to 5 as follows :

1 = No visible symptoms

2 = Upto 25 % root-rotting

3 = 25 - 50 % roots with symptoms

4 = 51 - 90 % roots with symptoms and many roots dead

5 = above 90 % roots with symptoms and plants dead

RESULTS AND DISCUSSION

In vitro studies :

B. subtilis isolates 1 and 2 have not produced any inhibition zone, while isolates 3 to 7 produced inhibition zone ranging from 8 to 18.3 mm against the pathogen. Maximum inhibition was produced by isolate 5 and minimum by isolate 3. Isolates 4, 6 and 7 produced 10, 16.7 and 16.7 mm respectively (Table I).

Table 1. *In vitro* screening of *Bacillus subtilis* against *Fusarium solani*.

Tableau I. Evaluation in vitro de *Bacillus subtilis* par rapport à *Fusarium solani*.

Isolates	Radial inhibition zone in mm
Isolats	Zone d'inhibition radiaire en mm
B. S1	0
B. S2	0
B. S3	8
B. S4	10
B. S5	18.3
B. S6	16.7
B. S7	16.7
F. values / Valeurs F.	**
C.D. 5 %	0.896

In vivo studies :

Under pot studies, isolate 5 has provided maximum protection against the disease. Plants treated with isolate N° 5 has shown only 20 % rotting, mainly of feeder roots, while in isolates 6 and 7 the percentage of root-rotting was 44 and 29 respectively with both secondary and tertiary roots affected. The percentage disease control was 67.96 in isolate 5 ; 31.07 in isolate 6 and 54.36 in isolate 7 (Table II).

B. subtilis has been shown to be an effective biocontrol agent on many soil borne pathogens such as *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani* and *Macrophomina phaseolina* causing root-rot diseases on various crops (Podile *et al.*, 1988 ; Zhang *et al.*, 1990 ; Sridar *et al.*, 1991). In the present study it has been tested for the first time against *F. solani* and an isolate *B. subtilis* N°5 was found effective to control the disease up to 68 %.

Table II. Effect of *B. subtilis* isolates in controlling root-rot of mulberry (pot culture).

Tableau II. Effet des isolats *B. subtilis* dans le contrôle du pourrissement des racines (culture en pot).

Treatments	% root rotting after 60 days of treatment and disease index	# % disease control
Traitements	% de pourrissement après 60 jours de traitement et indice de maladie	% de contrôle de maladie
Control / Témoin (<i>F. solani</i> alone) / (<i>F. solani</i> seul)	64.38 (4)	-
B. S 5 + <i>F. solani</i>	20.63 (3)	67.96
B.S 6 + <i>F. solani</i>	44.38 (3)	31.07
B. S 7 + <i>F. solani</i>	29.38 (3)	54.36
F. values / Valeurs F.	**	
C.D. 5 %	2.090	

B. s = *Bacillus subtilis*.

Figures in parenthesis indicate root-rot index.

Les chiffres entre parenthèses indiquent l'indice de pourrissement des racines.

** = significant at 1 and 5 % / significatif au seuil de 1 et 5 %.

$$\# = \% \text{ disease control} = \% \text{ de contrôle de la maladie} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Where C = Control / Pour C = Témoin

T = Treatment / T = Traitement

B. subtilis is reported to produce extracellular antibiotics that are inhibitory to many pathogens (Podile *et al.*, 1988). The production and activity may vary from isolate to isolate which explains the reason for differential disease control in different isolates in the present study.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr.R. K. Datta, Director, Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore for providing facilities for the study, Dr. G. S. Saddler, IMI, U.K. for confirming the identity of *B. subtilis*, and Ms M. Rekha for statistical analysis.

REFERENCES

- BELL D.K., WELLS H.D. and MARKHANS C.R. (1982) *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72 (4) : 379-382.
- BUCHANAN R.E. and GIBBSON (Ed.) (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 620-621.
- GRAY L. E. and AEHENBACH L. A. (1996) Severity of foliar symptoms and root and crown rot of soyabean inoculated with various isolates and inoculum rates of *Fusarium solani*. *Plant disease* 80 (10) : 1197-1199.
- PAPAVIZAS G. C. LUMSDEN R.D. (1980) Biological control of soil-borne fungal propagules. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 18 : 389-413.
- PHILIP T., LATHA J., GOVINDAIAH, MALLIKARJUNA B., K.C. MONDAL, A. K. BAJPAI and R. K. DATTA (1995) Some observations on the incidence, associated microflora and control of root rot disease of mulberry. *Indian J. Seric.*, 34 (2) 137-139.
- PODILE A. R., DILEEPKUMAR B. P. and DUBE H. C. (1988) Antibiosis of rhizobacteria against some plant pathogens. *Indian J. Microbiol.*, 28. 108-111.
- SRIDAR R., G. RAMAKRISHNAN and R. JEYARAJAN (1991). Studies on the efficacy of *Bacillus subtilis* against the root rot fungus *Macrophomina phaseolina* on urd bean. *J. Bio. Control* (5 (1) 59-60.
- TAKAHASHI S., YUAKOYOSHIDA, MICHIC K., SHIGEHARU I. and TARO N. (1979) Studies on actinomycetales producing antibiotics only on agar culture (1). Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain S. F. 1993. *Journal of Antibiotics* 32 : 327-746.
- WAKSMAN S. A. (1927) *Principles of soil microbiology*. Baltimore Williams & Wilkins, W., USA
- WELLER D. (1988) Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopath.*, 26 : 379-407.
- ZHANG B. X., GÉ O. X., CHEN D. H., WANG Z. Y. and HE S. S. (1990) Biological and chemical control of root disease on vegetable seedlings in Zhejiang province, China. In : *Biological control of soil borne plant pathogens*. (Ed) D. Homby. CAB International pp 181-196.

EFFET ANTAGONISTE DE *BACILLUS SUBTILIS* SUR LE CHAMPIGNON DU POURRISSEMENT DE LA RACINE CHEZ LE MURIER, *FUSARIUM SOLANI*

T. PHILIP & D.D. SHARMA

Central Sericultural Research and Training Institute, Research Extension Centre,
Angamaly 683 572, Kerala, Inde.

*Le pourrissement des racines causé par **Fusarium solani** inflige un dommage considérable au mûrier (**Morus alba** L.). La maladie provoque une décoloration soudaine de la feuille, une défoliation et la mort de la plante. En Inde du sud, le taux est de 3 à 55 %. Considérant la nécessité de réduire l'utilisation des fongicides dans un but écologique, un contrôle biologique de la maladie a été tenté. Dans cette étude, sept isolats de **Bacillus subtilis** ont été testés contre le champignon par des tampons sur gélose et des cultures en pot. Lors d'études **in vitro**, 5 isolats ont produit des zones d'inhibition du pathogène allant de 8 à 18,3 mm, tandis que les autres étaient inefficaces. L'isolat no. 5 a produit une inhibition maximum. En ce qui concerne les études de culture en pot, cet isolat réduit la maladie jusqu'à 68 % et a été sélectionné pour une évaluation plus poussée en extérieur.*

INTRODUCTION

Le pourrissement du mûrier causé par *Fusarium solani* provoque des dommages considérables, cette maladie entraînant une décoloration soudaine de la feuille, la défoliation puis la mort des plantes. En Inde du sud, l'incidence de cette maladie varie entre 3 et 55 %. Le trempage des racines de boutures dans une solution à 0,1 % de carbendazim, 50 % d'une poudre humidifiable pendant une demi heure et le soupoudrage des trous de plantations avec 3 à 4 g. d'indofil M 45 ont permis d'apporter une protection d'environ 95 % contre la maladie (Philip et coll., 1995). Cependant, en considérant la nécessité de réduire l'utilisation des fongicides chimiques dans un but écologique, un contrôle biologique de la maladie a été entamé. Plusieurs espèces et isolats de *Trichoderma* et *Bacillus subtilis* ont été signalées comme des agents efficaces chez plusieurs cultures portant de nombreux pathogènes du sol (Papavizas et Lumsden 1980 ; Bell et coll. 1982 ; Weller 1988). Dans cette étude, sept isolats de *Bacillus subtilis* ont été testés *in vitro* et les plus efficaces d'entre eux contre *F. solani* *in vivo* en culture en pot pendant la période de 1995 à 1997.

MATERIELS ET METHODES

Pendant l'étude conduite sur les circonstances et les incidences de la maladie de la putréfaction des racines en Inde du sud, des échantillons de sol ont été collectés dans différentes mûraies et *Bacillus subtilis* a été isolé par la technique de dilution du sol sur plaque (Waksman, 1927). Quelques isolats de *B. subtilis* ont été obtenus des feuilles de mûriers. Ils ont été identifiés en se basant sur le manuel de Bergey, Determinative Bacteriology (Buchnan et Gibson, 1974) et confirmé plus tard par l'Institut International de Mycologie, G.B.

Evaluation *in vitro* :

L'évaluation *in vitro* pour l'identification d'isolat efficace de *B. subtilis* a été faite avec des tampons sur gélose (Takahashi et coll., 1979). La suspension de spores de *F. solani* dans de l'eau distillée a été mélangée à de l'agar Czepak et posée sur des boîtes de Petri de 10 cm de diamètres.

Au centre de ces boîtes, un tampon de 4 mm de diamètres des différents isolats de *B. subtilis* obtenus par une culture vieille de 36 heures a été déposé. L'ensemble a été incubé à température ambiante de 28 ± 2 °C pendant cinq jours, c'est alors que la zone d'inhibition formée autour des tampons de *B. subtilis* a été mesurée en distance nette entre la périphérie du tampon et la croissance du pathogène sur la plaque à partir de trois directions différentes.

Etudes *in vivo* (culture en pot) :

Des boutures de mûriers S 36, vieilles de six mois ont été plantées dans des pots en terre de 25 cm de diamètres contenant environ 2 kgs de terre stérilisée. *F. solani* a été multiplié sur des milieux sableux de maïs puis inoculé au taux de 5 g par kg de sol. Les isolats *B. subtilis* 5, 6 et 7 qui ont poussé pendant 36 heures dans un bouillon nutritif de gélose contenant 5×10^6 cfu / ml ont été inoculés au taux de 5 ml par répétition. Les traitements sont les suivants :

T1 = *F. solani* seul (témoin)

T2 = *F. solani* + *B. subtilis* Isolat N° : 5

T3 = *F. solani* + *B. subtilis* Isolat N° : 6

T4 = *F. solani* + *B. subtilis* Isolat N° : 7

Chaque traitement et contrôle ont été reproduits huit fois. Les données concernant l'incidence du pourrissement des racines chez les témoins et les traitements ont été notées 60 jours après le traitement en déracinant délicatement les plants. La sévérité du pourrissement des racines a été calculé en suivant Gray et Aehenbach (1996) avec un indice numérique de 1 à 5, comme indiqué ci-dessous :

1 = pas de symptômes visibles

2 = jusqu'à 25 % pourrissement des racines

3 = 25 - 50 % de racines avec des symptômes

4 = 51 - 90 % de racines avec des symptômes et de nombreuses racines mortes

5 = plus de 90 % de racines avec des symptômes et des plants morts

RESULTATS ET DISCUSSION**Etudes *in vitro* :**

Les isolats *B. subtilis* 1 et 2 n'ont formé aucune zone d'inhibition, tandis que les isolats 3 à 7 ont montré une zone d'inhibition du pathogène variant de 8 à 18,3 mm. Une inhibition maximale a été produite par l'isolat 5 et l'inhibition minimum par l'isolat 3. Les isolats 4, 6 et 7 ont produit respectivement 10 ; 16,7 et 16,7 mm (Tableau II).

Etudes *in vivo* :

En ce qui concerne les études faites en pot, l'isolat 5 a montré une protection maximale contre la maladie. Les plants traités avec l'isolat 5 ont donné un pourrissement de 20 % seulement, principalement les racines nourricières, tandis que pour les isolats 6 et 7, le pourcentage de pourrissement était respectivement de 44 et 29 avec pour les deux, des racines secondaires et tertiaires atteintes. Le pourcentage de contrôle de la maladie a été de 67,96 pour l'isolat 5 ; 31,07 pour l'isolat 6 et 54,36 pour l'isolat 7 (Tableau II).

Il a été noté que *B. subtilis* est un agent efficace de contrôle sur de nombreux pathogènes du sol tels que *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solani* et *Macrophomina phaseolina* provoquant les maladies de pourrissement des racines sur diverses récoltes (Podile et coll., 1988 ; Zhang et coll., 1990 ; Sridar et coll., 1991). Dans cette étude, il a été testé pour la première fois contre *F. solani* ; l'isolat *B. subtilis* n° 5 s'est avéré efficace pour contrôler la maladie jusqu'à 68 %.

B. subtilis est signalé comme producteur d'antibiotiques extracellulaires qui sont inhibiteurs pour de nombreux pathogènes (Podile et coll., 1988).

INFLUENCE OF INTERCROPPING ON SEVERITY OF RUST DISEASE IN MULBERRY

K. V. PRASAD, B. R. DAYAKAR YADAV* & S. B. SULLIA**

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore 560 062, India.

Peridiopsora mori (Barclay) Prasad et al. causes rust epidemics on mulberry foliage during August to February of every year and results in reduction of biomass production by premature defoliation. By intercropping the legumes viz. soybean or greengram in between mulberry rows with 1: 2 and 1: 3 row combination, a significant reduction in rust severity on mulberry was achieved with 15.5 ± 0.5 pustules per cm^2 leaf area compared to control having 21.5 ± 0.5 pustules. A similar trend was achieved by intercropping of forage crops viz. maize or ragi (African millet). Reduction of rust severity on mulberry leaf by intercropping of legume was comparatively higher than the forage crops.

Keywords: Mulberry, rust severity, *Glycine max*, *Phaseolus aureus*, *Zea mays*, *Eleusine coracana*, intercropping.

INTRODUCTION

In sericulture industry the favourable cocoon producing seasons happen to be periods of low leaf yield due to severity of foliar diseases caused by fungi.

Disease severity is quantifiable by directly correlating it with the extent of plant tissue affected by the disease (James, 1974).

The rust pathogen *Peridiopsora mori* (Barclay) Prasad et al., 1993 is an obligate parasite on foliage of *Morus alba* L. This pathogen is prevailing in anamorphic state and produces only urediniospores with thick wall for protection and urediniospores are the only form of inoculum which exists on soil surface associated with mulberry plant debris. Due to unfavourable climatic condition for rust establishment during May to July months, the inoculum hibernates on debris. During August to February the rust causes severe damage to mulberry leaves and later the severity of disease declines.

Irrigation is one of the principle means of increasing mulberry leaf biomass. According to Rotem and Palti (1969), diseases on crops became common after irrigation as a consequence of moisture and temperature changes which generated epidemic development of disease. The influence of intercropping on rust disease control depends on the interaction between conditions created by subsidiary crops with irrigation, weather factors, nature of the pathogen and crop variety.

In sericulture belts, different plant spacings are followed in traditional and nontraditional areas. Intercropping in wider spaced mulberry garden is practiced to achieve higher gross returns through maximum utilization of land in a unit area. Not much is known about the effect of rust caused by *Peridiopsora mori* on mulberry under different agronomical practices including intercropping.

* Central Silk Board, Bangalore 560 068, India (Address for correspondence).

**Department of Microbiology, Bangalore University, Jnana Bharathi Campus, Bangalore 560 056, India

Hence a detailed study was carried out to assess the rust disease severity on mulberry under different row arrangements of subsidiary crops which included both legumes and fodder crops in between mulberry rows.

MATERIALS AND METHODS

During 1989 to 1991 assessment of mulberry rust severity with intercropping was carried out at institute farm located at 12.58° N, 77.35° E and elevated at 914 MSL with 1.3% of organic carbon and 6.8 pH in soil.

The severity of rust disease was assessed on mulberry foliage of plants grown by applying farm - yard manure and chemical fertilizer as per the recommended dosage (Rangaswami *et al.*, 1976) under irrigated conditions. The irrigation was done once in a week based on soil type and precipitation.

The main crop being mulberry variety M-5 containing 45 plants in each treatment, mulberry plants were spaced at 120 cm between the rows and 60 cm between the plants. All the subsidiary crops were planted in between mulberry rows.

The subsidiary crops included soybean (*Glycine max* cv *monata* L. Merr) and greengram (*Phaseolus aureus* Roxb.) as legume crops and fodder crops such as maize (*Zea mays* L.) and ragi (*Eleusine coracana* L. Gaertn.) planted in rows in between mulberry under irrigated condition. For all the subsidiary crops, the package of practices followed was as per recommendations (Anonymous, 1982).

Subsidiary crops:

All subsidiary crops were planted in one, two and three rows in between mulberry rows - i.e., 1: 1, 1: 2 and 1: 3 as the main: subsidiary row ratio. Both soybean and greengram plants were spaced at 30 cm from row to row and 10 cm from plant to plant.

The severity of rust on mulberry leaf with soybean as intercrop was assessed during September to October of 1989 and 1990 and greengram during September to November 1990.

The forage as a subsidiary crop was planted in one, two and three rows in between mulberry rows during January to March with maize spaced at 60 × 30 cm and ragi spaced at 30 × 15 cm.

The severity of rust on mulberry leaf with maize as intercrop was assessed during January to March of 1990 and 1991; with ragi as intercrop was assessed during January to March 1991. The severity of rust on mulberry leaf after the harvest of soybean intercrop was assessed during November to December of 1989 and 1990. The disease severity found on mulberry plants without any subsidiary crop was considered as control for comparing the disease severity of other mulberry plants with intercropping treatments. The leaf harvest of 1st crop was made at 75 days from the date of pruning. The subsequent leaf harvest of 2nd crop was made at 135 days from the date of pruning. The rust pustules are small in size and are located on the adaxial surface of the leaf. The diseased area is much larger than sporulating area, hence visual rating becomes conservative.

To assess the severity of rust, the number of pustules per cm² leaf area were counted. To overcome the discrepancy that will occur due to visual rating assessment of rust severity on mulberry foliage, a modified methodology by counting the number of pustules (young and mature) per cm² leaf area was carried out. The counting of pustules was done at 3 random locations on each leaf from top most glossy leaf (positioned as 1st fully unfurled leaf from shoot apex) to the senescing leaf (last leaf on a shoot which is about to fall) of the same shootlet. Pustules were counted by placing a perspex graticule of 10 × 10 cm engraved with lines of 1 cm² on each leaf. The mean pustule number per cm² leaf area, i.e., "x", for each leaf of shoot was calculated. The "x" of all the leaves of a shoot were summed up and divided by the total number of leaves present on that shoot to obtain the mean severity of rust pustules $\bar{x}$ per cm² leaf area of the shoot. Thirty plants were selected for rust severity assessment from each treatment in a completely randomised design excluding border plants. The above procedure of obtaining $\bar{x}$ was repeated for 30 shootlets from 30 plants of a treatment wherein one robustly grown

shoot was considered from each plant. The $\bar{x}$ of all the 30 shootlets of a treatment was considered to calculate the grand mean $\bar{X}$ which depicted the rust severity by number of pustules per cm^2 area of leaf in a treatment.

The leaf first unfurled usually remains intact on the shoot up to 45 ± 5 days under pit system with irrigated condition in wider spaced mulberry plants.

Young silkworms (chawki) will be fed with tender and early medium leaves (i.e. 1st leaf to 6th leaf from shoot apex) for 10 days. Although penetration and establishment of rust pathogen occurs in late tender and early medium leaves, the appearance of pustule will be from 5th leaf onwards. Hence a clear picture of disease can be visualised on leaves of a shoot aged 55 ± 5 days from the time of bud sprouting. The leaf buds sprout usually 16 ± 4 days after pruning of shoot. More number of pustules were found on leaves of a shoot aged 65 ± 5 days old.

The assessment of the disease severity was carried out at two - week intervals up to 75 days from the date of pruning and the 5th assessment data was used for comparisons because it had higher pustule numbers.

The severity data recorded in all the treatments were subjected to statistical analysis (ANOVA). The observed difference between the mean number $\bar{X}$ pustules of the treatments was compared with critical difference (CD) value. Values obtained by Student's least significant difference at $P = 0.05$ was used to test the significance. The meteorological data on temperature, relative humidity and rainfall (if any) were recorded daily. The mean minimum and mean maximum temperatures in $^{\circ}\text{C}$ and mean relative humidity for each month and total rainfall in mm for each month were calculated and presented in Fig. 1.

RESULTS

In the years 1989 and 1990 during September - October months the severity of rust was more in pure stand of mulberry with pustules range of 15 - 18 per cm^2 leaf area. The severity of rust with a pustule range of 16 - 18 in 1: 1; 11 - 12 in 1: 2 and 10 - 11 in 1: 3 rows of combination were recorded on each square cm of mulberry leaf during September to October (Table I).

In the years 1989 and 1990 during November - December the rust severity was high in pure stand of mulberry crop with a range of 21 - 22 pustules per cm^2 leaf area. The severity of rust on leaf of mulberry plants wherein soybean plants were grown previously (during September - October) in between mulberry rows with a ratio of 1: 1; 1: 2 and 1: 3 rows and later harvested, a pustule range of 21 - 22, 15 - 16 and 15 - 16 per cm^2 respectively were recorded (November - December 1989 and 1990).

By correlating the results it was found that the increase in soybean planting density, lesser was the rust disease severity on mulberry leaf i.e. in 1: 2 and 1: 3 rows combinations. Even with postharvest of soybean the rust severity was significantly less on mulberry leaf in 1: 2 and 1: 3 rows combinations.

The disease severity trend with reference to intercropping was similar with other intercrops i.e., *P. aureus*, *Z. mays* and *E. coracana* (Table I).

DISCUSSION

The rust disease assessment on mulberry leaf was done once in two weeks by considering the regeneration span of *P. mori*, i.e. 14 ± 1 days. Hollier and King (1985) assessed infection level/severity of *Puccinia polysora* on *Zea mays* L. at 14 days after the inoculation and incubation.

The factors affecting infection gradients from the point source of *P. polysora* on *Zea mays* L. until 30th day at 10 days intervals were studied by considering regeneration time of uredo - stage (Cammack, 1958). He concluded that 3, 5 and 7th leaves chosen were not adequate since some plants showed the pustules on leaves other than those being assessed and consequently were not included in percentage of plants infected leading to quantitative error. To overcome the discrepancy in the

assessment of the severity of mulberry rust by using either scale or visual rating the actual number of pustules present in a unit area of leaf i.e., 1 cm² at 3 locations were counted and averaged.

A temperature range of 15 - 28° C and humidity of 70% and above, forms the ideal ecofactors for the rust disease establishment and its epidemics on mulberry (Prasad *et al.*, 1994). If the weather is dry the gushing of air from adjoining dry areas will keep the effect of microclimate to minimum as the same was observed with wider spacing of mulberry cultivation with less disease severity (Prasad *et al.*, 1994).

The dispersal of urediniospores occurring at the time when the leaves were covered by moisture is of obvious advantage to the pathogen. There is also the probability that irrigation will affect the survival of rust spores on plant debris and in the soil.

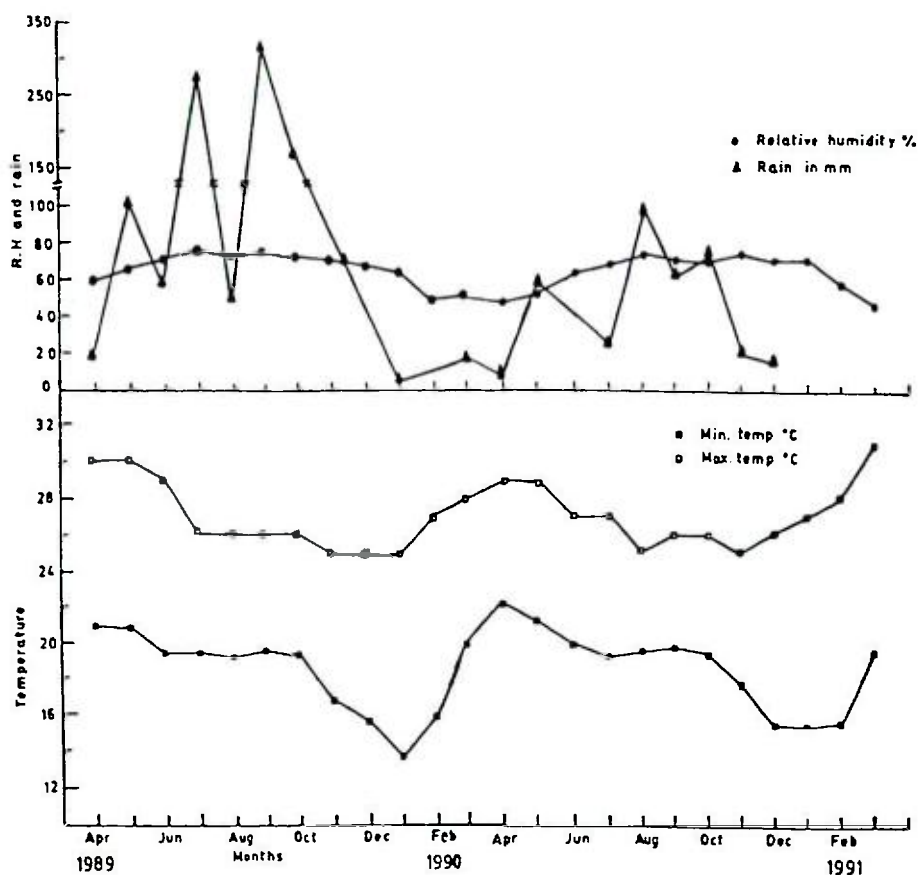


Fig. 1

Meteorologic data for the period 1989 April to 1991 March

Fig. 1. Meteorologic data for the period 1989 April to 1991 March.

Fig. 1. Données météorologiques pour la période avril 1989 à mars 1991.

Table I. Rust disease severity (Pustules/cm²) on mulberry leaf under different legume and fodder intercropping.*Tableau I. Sévérité de la maladie de la rouille (Pustules / cm²) sur la feuille de mûrier lors de cultures en lignes alternées avec des légumineuses et des plantes fourragères.*

Period and intercrop grown <i>Période et culture intercalée</i>	Intercrop designs <i>Types de cultures intercalées</i>				DF = 119 SE	CD
	1:0	1:1	1:2	1:3	<i>Ecart type</i>	P = 0.05
September - October 1989 with Soybean crop <i>Septembre - octobre 1989 avec la culture du soja</i>	15.7	15.6	10.7*	10.5*	0.04	0.08
November - December 1989 after soybean harvest <i>Novembre - décembre 1989 après la récolte du soja</i>	21.3	21.2	15.4*	15.3*	0.05	0.09
September - October 1990 with soybean crop <i>Septembre - octobre 1990 avec la culture du soja</i>	18.0	17.7	11.6*	11.4*	0.06	0.11
November - December 1990 after soybean harvest <i>Novembre - décembre 1990 après la récolte du soja</i>	22.0	21.9	16.4*	16.4*	0.04	0.09
September - November 1990 with greengram crop <i>Septembre - novembre 1990 avec la culture de pois-chiche</i>	21.3	21.0	11.9*	10.7*	0.05	0.10
January - March 1990 with maize crop <i>Janvier - mars 1990 avec la culture du maïs</i>	10.8	10.6	3.5*	3.3*	0.04	0.08
January - March 1991 with Maize crop <i>Janvier - mars 1991 avec la culture du maïs</i>	5.2	4.9	2.9*	2.5*	0.03	0.06
January - March 1991 with ragi crop <i>Janvier - mars 1991 avec la culture de ragi</i>	5.2	4.8	3.1*	2.7*	0.03	0.06

Intercrop designs / *Types de cultures alternées* :1: 0 = Mulberry only / *Mûrier seul.*1: 1 = 1 row mulberry + 1 row of subsidiary crop / *1 rang de mûrier + 1 rang de culture subsidiaire.*1: 2 = 1 row mulberry + 2 rows of subsidiary crop / *1 rang de mûrier + 2 rangs de cultures subsidiaires.*1: 3 = 1 row mulberry + 3 rows of subsidiary crop / *1 rang de mûrier + 3 rangs de cultures subsidiaires.** = Significant / *Significatif.*SE = Standard error / *Ecart type.*DF = Degree of freedom / *Degré de liberté.*

The mass ratio of leaf and shoot in mulberry is 50/60: 50/40 irrespective of spacings. The average leaf weight of M - 5 variety per plant in 120 × 60 cm spacing under irrigated condition is 400 - 475 g. With the intercropping of subsidiary crops, the average weight of leaf per plant in wider spacing was not altered much. The foliage of wider spaced mulberry plants is dark green, leathery. In wider spaced gardens sun rays act as natural disinfectant and the humidity in between rows and lower foliosphere will be reduced (lesser than 60%), thus creating unfavourable atmosphere for the phytopathogens, resulting in reduction of rust disease severity.

The legume intercropping with high planting density and broader dorsiventral leaves irrespective of short canopy reduced the rust disease severity more significantly on mulberry than fodder intercropping with narrow isobilateral leaves irrespective of high canopy. The reduction in disease severity may be attributed to the following reasons:

(i) Restricted air current in between mulberry stands which checks the dissemination of urediniospores.

(ii) Trapping of urediniospores by the nonspecific host. After the harvest of legume intercrop the severity of rust on mulberry leaf slightly increased on comparison with rust severity on mulberry leaf when soybean crop was previously present and this may be due to the change in the microclimate along with free movement of urediniospores in mulberry crop stand. However the correlation of results revealed that the rust disease severity was significantly less on mulberry leaf of the garden where soybean was previously grown. Reduction in severity of rust was comparatively more in legume intercropping than forage intercropping. This may be due to the lesser surface area offered by forage crops compared to the broad leaved legumes which trap urediniospores.

CONCLUSION

The urediniospores of *Peridiopsisora mori* are the only propagules involved in the spread of rust disease on mulberry foliage. The rust disease severity was significantly reduced by intercropping legume and or fodder crops between mulberry rows. Among the intercrops soybean was found more effective in reducing the rust disease severity on mulberry foliage. Higher soybean planting density in between mulberry rows makes the rust disease severity on mulberry foliage lower. The rust disease severity was significantly less on mulberry leaf after the harvest of soybean crop which is attributed to the reduction of urediniospores level in mulberry garden where soybean was previously grown.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Director, Divisional Chief (Moriculture) and Scientific officer I (Plant protection) of Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Bangalore for facilities. The authors thank A. R. Keshavan, Technical Officer (ICAR), Department of Statistics, University of Agricultural Sciences, Bangalore for help in Statistical analysis.

KVP thanks John Lacey and Maureen E. Lacey of Rothamsted experimental station, Harpenden, Herts, England for providing literature and valuable suggestions.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1982) Package of practices for high yield univ. Agric. Sci., G. K. V. K., Bangalore p 1 - 192.
- CAMMACK R. H. (1958) Factors affecting infection gradients from a point of source of *Puccinia polysora* in the plot of *Zea mays* L. Ann. Appl. Biol. 46: 186 - 197.
- HOLLIER C. A., KING S. B. (1985) Effects of temperature and relative humidity on germinability and infectivity of *Puccinia polysora* urediniospores. Plant Dis. 69: 937 - 939.
- JAMES W. C. (1974) Assessment of plant diseases and losses. Annu. Rev. Phytopathol. 12. 27 - 48.

- PRASAD K. V., DAYAKAR YADAV B. R., SULLIA S. B. (1993) Taxonomic status of rust on mulberry in India. *Curr. Sci.* 65 (5): 424 - 425.
- PRASAD K. V., DAYAKAR YADAV B. R., SULLIA S. B. (1994) Aerobiology of *Peridiopsora mori* causing mulberry rust. Edtr Agashe S. N. *Aerobiology* p 261 - 272.
- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M. N., KASIVISWANATHAN K., SASTRY C. A., JOLLY S. (1976) *Manual on Sericulture Vol. I, Mulberry Cultivation, Food and Agriculture Organisation Rome.* 1 - 150.
- ROTEM J., PALTI J. (1969) Irrigation and plant diseases. *Review of Phytopathology* p 267 - 288.

INFLUENCE DES CULTURES INTERCALEES SUR LA SEVERITE DE LA MALADIE DE LA ROUILLE CHEZ LE MURIER

K. V. PRASAD, B. R. DAYAKAR YADAV* & S. B. SULLIA**

Karnataka State Sericulture Research and Development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore 560 062, Inde.

Peridiopsora mori (Barclay) Prasad et coll. provoque des épidémies de rouille sur le feuillage du mûrier entre août et février de chaque année et entraîne une réduction de la production de la biomasse par une perte des feuilles prématurée. En intercalant des légumineuses à savoir, du soja ou du poids chiche entre les rangs de mûrier à raison d'un sur deux ou d'un sur trois, une réduction significative de la sévérité de la rouille sur le mûrier a été obtenue avec $15,5 \pm 0,5$ de pustules par cm^2 sur la surface foliaire, par rapport aux témoins qui en avaient $21,5 \pm 0,5$. Une tendance similaire a été obtenue en intercalant des cultures fourragères comme le maïs ou le ragi (millet africain). La réduction de la sévérité de la rouille sur les feuilles de mûrier, lorsqu'on intercale des cultures de légumineuses est comparativement plus importante que lorsqu'on intercale des cultures fourragères.

INTRODUCTION

Pour l'industrie séricicole, les saisons favorables à la production de cocons se trouvent être les périodes pendant lesquelles le rendement en feuilles est peu élevé, ceci étant dû à la sévérité des maladies foliaires causées par les champignons.

La sévérité de la maladie est quantifiable en la corrélant directement avec l'étendue des tissus végétaux affectés par la maladie (James, 1974).

Le germe pathogène de la rouille *Peridiopsora mori* (Barclay) Prasad et coll., 1993 est un parasite inhérent au feuillage de *Morus alba* L. Ce germe pathogène est plus répandu pendant son stade anamorphe et ne produit que des urédiniospores à membrane épaisse, qui leur sert de protection. Les urédiniospores sont la seule forme d'inoculum qui existe sur la surface du sol et sont associés aux débris de plants de mûrier. De mai à juillet, en raison des conditions climatiques défavorables à l'établissement de la rouille, l'inoculum hiberne sur les débris. D'août à février, la rouille porte de sévères préjudices aux feuilles de mûrier et après, la sévérité de la maladie décroît.

L'irrigation est l'un des principaux moyens pour augmenter la biomasse des feuilles de mûrier. Selon Rotem et Palti (1969), les maladies apparaissent fréquemment sur les cultures après l'irrigation ; ceci est une conséquence des changements d'humidité et de température qui génèrent le développement épidémique de la maladie. L'influence des cultures intercalées sur la lutte contre la maladie de la rouille dépend de l'interaction entre les conditions créées par les cultures subsidiaires avec l'irrigation, les facteurs météorologiques, la nature du germe pathogène et le type de culture.

Dans les zones séricicoles, différents espacements entre les plants sont pratiqués aussi bien dans des régions traditionnelles que non traditionnelles. L'intercalage des cultures dans de vastes

* Central Silk Board, Bangalore 560 068, Inde (Adresse pour correspondance).

** Department of Microbiology, Bangalore University, Jnana Bharathi Campus, Bangalore 560 056, Inde.

plantations de mûriers est pratiqué afin d'obtenir un meilleur rendement brut, grâce à l'utilisation maximum du sol dans un endroit délimité. Les effets de la rouille causée par *Peridiopsisora mori* sur le mûrier cultivé selon différentes pratiques agronomiques, y compris celle des cultures intercalées, sont peu connus.

C'est pourquoi une étude détaillée a été entreprise afin d'évaluer la sévérité de la maladie de la rouille sur le mûrier cultivé en rangs alternés avec des cultures subsidiaires, qui comprenaient à la fois des légumineuses et des cultures fourragères.

MATERIELS ET METHODES

De 1989 à 1991 l'évaluation de la sévérité de la rouille sur le mûrier en culture alternée a été conduite à la ferme de l'institut située à 12,58° N, 77,35° E et à 914 m d'altitude, avec 1,3 % de carbone organique et un pH du sol de 6,8.

La sévérité de la maladie de la rouille a été évaluée à partir du feuillage de plants de mûrier cultivés avec du fumier et des engrais chimiques suivant les doses recommandées (Rangaswami et coll., 1976) et dans des conditions de cultures irriguées. L'irrigation fut effectuée une fois par semaine selon le type de sol et les précipitations.

La principale culture de mûrier utilisée est la variété M - 5, avec 45 plants espacés de 60 cm pour chaque traitement, avec un espace de 120 cm entre les rangs. Toutes les cultures subsidiaires ont été plantées entre les rangs de mûrier.

Les cultures subsidiaires comprenaient comme légumineuses, le soja (*Glycine max* cv *monata* L. Merr) et le pois chiche (*Phaseolus aureus* Roxb.) et comme cultures fourragères, le maïs (*Zea mays* L.) et le ragi (*Eleusine coracana* L. Gaertn.). Ces cultures ont été plantées en rangs alternés avec les rangs de mûrier et dans des conditions de cultures irriguées. Pour toutes les cultures subsidiaires, l'ensemble des pratiques suivies fut celui des recommandations (Anonyme, 1982).

Cultures subsidiaires :

Toutes les cultures subsidiaires ont été plantées en un, deux ou trois rangs entre les rangs de mûrier, à savoir 1 : 1, 1 : 2 et 1 : 3 ceci exprimant le ratio rang de culture principale : subsidiaire. Les plants de soja et de pois chiche sont espacés de 10 cm entre eux et de 30 cm entre les rangs.

La sévérité de la rouille sur les feuilles de mûriers cultivées en alternance avec le soja a été évaluée de septembre à octobre 1989 et 1990 et celle alternée avec le pois chiche, de septembre à novembre 1990.

Les plantes fourragères comme culture subsidiaire ont été plantées à raison de un, deux et trois rangs entre les rangs de mûrier de janvier à mars avec un espacement de 60 × 30 cm pour le maïs et de 30 × 15 cm pour le ragi.

La sévérité de la rouille sur les feuilles de mûriers cultivés en rang alterné avec le maïs, a été évaluée de janvier à mars 1990 et 1991 ; avec le ragi, elle fut évaluée de janvier à mars 1991. La sévérité de la rouille sur les feuilles de mûrier après la récolte du soja, a été évaluée de novembre à décembre 1989 et 1990. Les plants de mûrier cultivés seuls, servirent de témoins, pour la comparaison de la sévérité de la maladie de la rouille avec les autres plants de mûrier cultivés avec des cultures intercalaires. La cueillette des feuilles de la première culture fut effectuée 75 jours après la date de la taille. La cueillette des feuilles de la deuxième culture fut effectuée 135 jours après la date de la taille. Les pustules de la rouille sont de petite taille et sont situées sur la surface ventrale de la feuille. La surface malade est beaucoup plus importante que la surface sporulante, par conséquent l'évaluation visuelle est retenue.

Afin d'évaluer la sévérité de la rouille, le nombre de pustules par cm² de surface foliaire a été compté. Dans le but de compenser l'écart dû à l'évaluation visuelle de la sévérité de la rouille sur le feuillage du mûrier, une méthodologie modifiée a été appliquée, en comptant le nombre de pustules (jeunes et mûres) par cm² de surface foliaire. En partant de la feuille brillante la plus haute

(positionnée comme la première feuille entièrement déroulée au sommet de la pousse) à la feuille sénescence (dernière feuille sur une pousse qui soit prête à tomber), le comptage des feuilles fut effectué aléatoirement à 3 endroits sur chacune des feuilles d'un même plant. Les pustules ont été comptées en plaçant un micromètre en perspex de 10×10 cm sur lequel des lignes de 1 cm² ont été gravées. Le nombre moyen de pustules par cm² de surface foliaire à savoir ' $\bar{x}$ ' a été calculé, pour chacune des feuilles de chaque plant. Les moyennes ' $\bar{x}$ ' de chacune des feuilles d'un même plant ont été additionnées et divisées par le nombre total de feuilles présentes sur ce plant afin d'obtenir la sévérité moyenne $\bar{x}$ des pustules par cm² de surface foliaire du plant. Trente plants ont été sélectionnés pour l'évaluation de la sévérité de la rouille pour chaque traitement, d'une manière totalement aléatoire, en excluant les plants situés à la périphérie. La procédure citée ci-dessus qui permet d'obtenir $\bar{x}$ fut répétée sur 30 tiges de 30 plants d'un traitement, où une seule tige robuste fut considérée pour chaque plant. Le nombre $\bar{x}$ de chacune des 30 tiges de 30 plants d'un traitement a été considéré afin de calculer la moyenne $\bar{X}$ qui décrit la sévérité de la rouille par le nombre de pustules par cm² de surface foliaire dans un traitement.

La première feuille déroulée reste généralement intacte sur la plantule jusqu'à 45 ± 5 jours dans du terreau, avec des conditions de culture irriguée et dans de vastes plantations de mûrier.

Les jeunes vers à soie (chawki) sont nourris avec des feuilles tendres et moyennement tendres (i.e. de la première feuille à la sixième feuille du sommet de la plantule), pendant 10 jours. Bien que la pénétration et l'établissement du germe pathogène apparaissent au niveau des feuilles situées au milieu et en haut de la plantule, l'émergence des pustules se fera à partir de la cinquième feuille. Ainsi, une image claire de la maladie peut être visualisée sur les feuilles d'une plantule âgée de 55 ± 5 jours à partir du moment du bourgeonnement. Les bourgeons des feuilles apparaissent généralement 16 ± 4 jours après la taille de la plante. Un nombre plus important de pustules a été noté sur des feuilles de plante âgée de 65 ± 5 jours.

L'évaluation de la sévérité de la maladie fut conduite à deux semaines d'intervalle, jusqu'à 75 jours de la date de la taille et les données de la cinquième évaluation furent utilisées à des fins de comparaison en raison du nombre plus important de pustules.

Les données de la sévérité de la maladie pour tous les traitements ont été sujets à une analyse statistique (ANOVA). La différence observée entre le nombre moyen $\bar{X}$ des pustules des traitements fut comparé avec la valeur de la différence critique (CD). Les valeurs obtenues par la différence la moins significative de Student à $P = 0.05$ ont été utilisées pour tester la valeur significative. Les données météorologiques sur la température, l'humidité relative et les précipitations (quand il y en eut) ont été enregistrées quotidiennement. Les moyennes minimum et maximum des températures en °C, la moyenne de l'humidité relative par mois ainsi que le total des précipitations en mm par mois ont été calculées et présentées en Fig. 1.

RESULTATS

Au cours des années 1989 et 1990, pendant les mois de février à octobre, la sévérité de la rouille était plus importante chez les mûriers cultivés seuls, avec un nombre de pustules de 15 à 18 par cm² de surface foliaire. La sévérité de la rouille avec un nombre de pustules de 16 à 18 dans les cultures alternées 1 : 1, de 11 à 12 dans celles alternées 1 : 2 et de 10 à 11 pour celles alternées 1 : 3. Ces nombres respectifs ont été enregistrés sur chaque centimètre carré de feuille de mûrier de septembre à octobre (Tableau I).

Au cours des années 1989 et 1990, pendant les mois de novembre et décembre, la sévérité de la rouille était élevée chez les mûriers cultivés seuls avec un nombre de 21 à 22 pustules par cm² de surface foliaire. La sévérité de la rouille sur les feuilles de mûrier où des plants de soja avaient été cultivés précédemment (de septembre à octobre) en culture intercalée avec un ratio de 1 : 1, 1 : 2, et 1 : 3 et récoltées ultérieurement, donnent un nombre de pustules de 21 - 22, 15 - 16 et 15 - 16 par cm² respectivement (novembre à décembre 1989 et 1990).

En mettant en corrélation les résultats, il a été remarqué que plus on augmentait la densité de plantations de soja, moins la sévérité de la maladie sur les mûriers était importante i.e. dans les combinaisons de rang de 1 : 2 et 1 : 3. Même dans le cas de récolte post - soja, la sévérité de la rouille était significativement moins importante sur les feuilles de mûrier dans les combinaisons de rangs de 1 : 2 et 1 : 3.

La tendance observée en référence aux cultures intercalées est similaire aux autres cultures intercalées i.e. *P. aureus*, *Z. mays* et *E. coracana* (Tableau I).

DISCUSSION

L'évaluation de la maladie de la rouille sur la feuille de mûrier fut réalisée une fois toutes les deux semaines en prenant en compte le temps de régénération de *P. mori*, i.e. 14 ± 1 jours. Hollier et King (1985) évaluèrent la sévérité / le niveau d'infection de *Puccinia polysora* sur *Zea mays* L., 14 jours après l'inoculation et l'incubation.

Les facteurs qui affectent les gradients d'infection à partir du point source de *P. polysora* sur *Zea mays* L. jusqu'au 30^{ième} jour à 10 jours d'intervalle, ont été étudiés en prenant en compte le temps de régénération du stade uredo (Cammack, 1958). Il en a conclu que les troisième, cinquième et septième feuilles choisies n'étaient pas adéquates puisque quelques plants exhibèrent des pustules sur d'autres feuilles que celles qui furent évaluées et par voie de conséquence, ne furent pas comprises dans le pourcentage de plants infectés, ce qui conduit à une erreur quantitative. Afin de compenser l'écart d'évaluation de la sévérité de la rouille du mûrier en utilisant soit une évaluation visuelle soit une échelle, le nombre réel de pustules présentes sur une surface donnée de feuille i.e., 1 cm² dans trois endroits différents a été compté, puis une moyenne a été établie.

Une température comprise entre 15 et 28°C et une humidité d'au moins 70 % forment un ensemble d'écotacteurs idéal pour l'établissement de la maladie de la rouille et de son épidémie sur le mûrier (Prasad et coll., 1994). Si le temps est sec, les arrivées d'air des régions sèches adjacentes maintiendront l'effet de microclimat à un minimum. La même observation a été faite avec des cultures de mûrier plus espacées et dont la sévérité de la rouille était moindre (Prasad et coll., 1994).

La dispersion des urédiniospores qui apparaît au moment où les feuilles sont couvertes d'humidité est un avantage majeur pour le germe pathogène. Il existe aussi la probabilité que l'irrigation joue un rôle dans la survie des spores de la rouille dans les débris des plantes et dans le sol.

Le ratio de la masse des feuilles et des tiges chez le mûrier est respectivement de 50 / 60 : 50 / 40 quel que soit l'espacement. Le poids moyen des feuilles d'un plant de la variété M - 5 espacé de 120 × 60 cm et sous des conditions de culture irriguée, est compris entre 400 et 475 g. Avec l'intercalage de cultures subsidiaires, le poids moyen des feuilles par plant, dans des cultures plus espacées ne diffère pas beaucoup. Le feuillage des plants de mûrier largement espacés est vert foncé et ressemble à du cuir. Dans les plantations où les mûriers sont largement espacés, le soleil agit comme un désinfectant naturel. L'humidité entre les rangs et la foliosphère est réduite (moins de 60 %), créant alors une atmosphère défavorable pour les phytopathogènes, ce qui a pour conséquence une réduction de la sévérité de la maladie de la rouille.

L'intercalage des légumineuses avec une densité de plantation élevée et possédant des feuilles plus larges, sans tenir compte de la petite canopée, réduit la sévérité de la maladie de la rouille de façon plus significative sur le mûrier qu'avec des cultures fourragères intercalées possédant des feuilles isobilatérales étroites, sans tenir compte de la haute canopée. La diminution de la sévérité de la maladie peut être attribuée aux raisons suivantes :

(i) Un courant d'air restreint entre les rangs de mûrier, ce qui contrôle la dissémination des urédiniospores.

(ii) La capture des urédiniospores par l'hôte non spécifique. Après la récolte de la culture intercalée de légumineuses, la sévérité de la rouille sur la feuille de mûrier augmenta légèrement en comparaison avec la sévérité de la rouille sur la feuille de mûrier après qu'une culture intercalée de

soja ait été présente ; ceci pourrait être dû au changement du microclimat ainsi qu'à la libre circulation des urédiniospores dans les rangs de mûriers cultivés seuls. Cependant, la mise en corrélation des résultats révèle que la sévérité de la maladie de la rouille était significativement moins importante sur les feuilles de mûrier provenant de la plantation où du soja avait précédemment été cultivé. La diminution de la sévérité de la rouille fut comparativement plus importante chez les mûriers intercalés avec les légumineuses, que chez les mûriers intercalés avec les cultures fourragères. Ceci semble être dû à la surface foliaire moins importante offerte par les cultures fourragères en comparaison avec les légumineuses à larges feuilles qui fonctionnent comme des pièges à urédiniospores.

CONCLUSION

Les urédiniospores de *Peridiopsora mori* sont les seules propagules impliqués dans la dispersion de la maladie de la rouille sur le feuillage du mûrier. La sévérité de la maladie de la rouille a été diminuée de façon significative en intercalant des légumineuses et ou des cultures fourragères entre les rangs de mûrier. Parmi les cultures intercalées, le soja fut plus efficace pour diminuer la sévérité de la maladie de la rouille sur le feuillage du mûrier. Une densité de plantation de soja plus importante entre les rangs de mûrier favorise une diminution de sévérité de la maladie de la rouille. La sévérité de la maladie de la rouille était significativement moins importante sur la feuille de mûrier après la récolte de la culture du soja, ce qui est attribué à la réduction du niveau des urédiniospores dans la plantation de mûrier où le soja avait été précédemment cultivé.

EFFECT OF DIFFERENT COMBINATIONS OF NPK FERTILIZERS ON THE YIELD AND NUTRITIVE VALUE OF *TERMINALIA ARJUNA*

U.S.P. SINHA, Md. ISA, D.P. SRIVASTAVA*, A.K. SINHA & B.N. BRAHMACHARI

Central Tasar Research & Training Institute, P. O. Piska Nagri, Dist. - Ranchi (Bihar), India.

Studies on the effect of thirteen different combinations of NPK on the quality and leaf yield of Terminalia arjuna under 1.2 m × 1.2 m spacing revealed that the combination of N: P: K = 150: 50: 50 kg. per ha. per year, is the best among all. This combination on application gave 47.62% increase in leaf yield over control. Chemoassay and bioassay results also confirmed significant improvement in the quality of leaf by the application of the combination N150: P50: K50. Besides, the aforesaid combination gives the highest profit among all treatments under studies on calculation of economics.

Keywords: *Terminalia arjuna*, leaf yield, fertilizer, chemoassay, bioassay.

INTRODUCTION

Terminalia arjuna is one of the primary food plant of tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury (Jolly *et al.*, 1968). The plant is basically tree and commonly found on the bank of rivers and streams in Central India. Extensive economic plantation under Inter State Tasar Project has been raised with this plant for controlled rearing of the above insect in addition to traditional rearing on forest plantation. Its continuous cultivation in the same field year after year depletes the soil fertility. Balanced fertilization is one of the quickest and cheapest means to replenish these losses. The role of nitrogen, phosphorus and potassium in plant nutrition and metabolism is well known. Sufficient results are available on the effect of fertilization on the leaf yield in mulberry (Kasiviswanathan and Iyengar, 1965, 1966, 1969, 1970; Pain, 1965). However, no systematic work has been reported so far on the effect of fertilizers for tasar food plants. The present paper describes the effect of different combinations of NPK fertilizers on the qualitative and quantitative characters of *T. arjuna* leaves.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in the experimental field of Central Tasar Research and Training Institute, Nagri, Ranchi on *Terminalia arjuna* plantation with 1.2m × 1.2m spacing under rainfed condition. Before the lay out of the experiment, the fertility gradient of the field was studied and it was observed that the plot is quite uniform. So far as the type of the soil is concerned it was found to be sandy loam laterite with pH 5.5, organic carbon 0.337%, available phosphorus (P205) 34.409 kg/ha. and available potassium (K2O) 80.640 kg./ha. Chemical analysis of the farm soil was done by the method of Piper (1950). N, P and K were applied in the form of Urea, Single Super Phosphate and Muriate of Potash respectively. Nitrogenous fertilizer was applied in three equal split doses during the month of June, July and August. Phosphorus and potash fertilizers were applied in single dose in the month of June. In addition farm yard manure was applied @ 6MT/ha. every year during June

* Central Silk Board, Bangalore, India.

along with basal dose of NPK. The experiment was laid out in Randomised Block Design with thirteen treatments in three replications. In each replication, 36 plants were considered. The treatments include five levels of nitrogen and four levels each of phosphorus and potassium.

N0 = 0 kg N/ha/yr.	P0 = 0 kg P/ha/yr.	K0 = 0 kg K/ha/yr.
N1 = 50 kg N/ha/yr.	P1 = 25 kg P/ha/yr.	K1 = 25 kg K/ha/yr.
N2 = 100 kg N/ha/yr.	P2 = 50 kg P/ha/yr.	K2 = 50 kg K/ha/yr.
N3 = 150 kg N/ha/yr.	P3 = 75 kg P/ha/yr.	K3 = 75 kg K/ha/yr.
N4 = 200 kg N/ha/yr.		

Thirteen treatments are as follows:

T1: N1P1K1, T2: N1P2K2, T3: N1P3K3, T4: N2P1K1, T5: N2P2K2, T6: N2P3K3, T7: N3P1K1, T8: N3P2K2, T9: N3P3K3, T10: N4P1K1, T11: N4P2K2, T12: N4P3K3, T13: N0P0K0.

Simple Random Sampling method was followed for collecting the samples for the study under reference. Leaf samples were collected after 45 days of the application of fertilizers in the field excluding too tender and over mature leaves from each plot under all treatments. Chemical constituents like moisture, minerals, crude fibre and total carbohydrate were estimated following the method of A. O. A. C. (1950). Nitrogen content was estimated by Kjeldahl's method and crude protein was calculated by multiplying the estimated value of the nitrogen content by 6.25.

For the assessment of nutritional effect, disease free layings of *A. Mylitta* was brushed and reared in three replicated batches of 100 worms each following the rearing technique of Jolly *et al* (1974) during second crop (Sept. - Nov.). The method suggested by Arunachalam and Bandyopadhyay (1984) was followed to decide the ranking of different treatments of NPK under study for different parameters.

RESULTS AND DISCUSSION

The total leaf yield of three years and also pooled mean of three years are given in Table I. Results indicate that effect due to different combinations of NPK were highly significant in all the years. The finding corroborates the studies of Pain (1965) who also reported highest mulberry leaf yield in the NPK combinations. Among different doses of nitrogen tried viz. 0, 50, 100, 150 and 200 kg. N/ha., no significant difference in yield was observed between 150 and 200 kg. N/ha. in all the three years. Kasiviswanathan and Iyengar (1965) did not find any significant difference in mulberry yield between 100, 150 and 200 kg. N/ha. in three out of five seasonal harvests. The effects of potash and phosphatic fertilizers have not been marked so effective as that of nitrogen on the yields of *T. arjuna* leaves, although they also contributed for increased yields. Treatments T1, T2, and T3 do not differ significantly among themselves. Similarly treatments T4, T5 and T6 are at par. There was no significant difference in leaf yield among the treatments T8, T9, T10, T11 and T12. The increase in leaf yield was highest (47.62% over control) in treatments T8 (37603.89), T11 (37603.78) and T12 (37603.89) kg per ha. Among these treatments T8 i. e. N3P2K2 can be considered as the best because in this treatment lower dose of fertilizers were applied.

Table II shows the average chemical composition of *T. arjuna* leaf under different treatments. It is evident from Table II that application of NPK has improved the quality of leaf. Except crude fibre, contents of moisture, crude protein, total carbohydrate and total minerals were significantly higher in treated plant leaves than control. The present observation supports the work of Ray *et al.* (1973) who also reported the significant effect of nitrogen levels on moisture, crude protein and total mineral contents. Gupta and Das (1962) observed the effect of NPK application on the crude protein content of maize. Pain (1965) found that the application of NPK significantly increases the moisture, crude

protein and total carbohydrate contents of mulberry leaf. He also did not find any significant difference in the crude fibre content.

Treatments T7, T8, T9, T10, T11 and T12 do not differ significantly among themselves in respect of moisture content and contains the highest moisture content. Treatments T4, T5 and T6 behave equally and are placed under 2nd groups in decreasing order of contents of moisture. Treatments T1, T2 and T3 are placed at the 3rd lower ladder in this respect. Further, treatments T8, T9, T11 and T12 behave equally in respect of crude protein, total carbohydrate and mineral contents and are far superior as compared to control.

Table 1. Mean yield of *Terminalia arjuna* under different treatment in kg/ha.

Tableau I. Rendement moyen de *Terminalia arjuna* sous différents traitements en kg / ha.

S1 No.	Treatment	Year I	Year II	Year III	Average of 3 years	Increase in yield over control in percentage
<i>S1 No.</i>	<i>Traitement</i>	<i>An I</i>	<i>An II</i>	<i>An III</i>	<i>Moyenne des 3 ans</i>	<i>Augmentation du rendement par rapport au témoin en %</i>
T1	N1P1K1	28589.67	27311.67	26639.00	27513.45 e	8.01
T2	N1P2K2	28926.34	27715.34	26773.34	27805.00 e	9.16
T3	N1P3K3	29262.34	27984.34	26975.34	28074.00 de	10.21
T4	N2P1K1	29800.67	28926.00	28589.67	29105.45 cd	14.26
T5	N2P2K2	30271.67	29060.67	28926.34	29419.56 c	15.49
T6	N2P3K3	30473.34	29262.34	29060.67	29598.78 c	16.20
T7	N3P1K1	36370.00	36105.00	33635.00	35370.00 b	38.85
T8	N3P2K2	38007.67	40025.67	34778.33	37603.89 a	47.62
T9	N3P3K3	37940.33	39958.33	34711.33	37536.67 a	47.35
T10	N4P1K1	37873.33	39823.67	32962.33	36886.45 a	44.81
T11	N4P2K2	38074.82	39958.18	34778.33	37603.78 a	47.62
T12	N4P3K3	38007.67	40092.92	34711.08	37603.89 a	47.62
T13	N0P0K0	26504.34	23746.34	26168.00	25472.89 f	—
	Control Témoin					
	S.Em ± / Ecart type	327.43	215.62	126.68	437.27	
	'F' test	***	***	***	***	
	CD at 5% level	955.61	629.29	369.71	1230.42	

N. B. : *** Denotes significant at 0.1% level / *** Indique une différence significative à 0,1 %.

Figures with different alphabets differ significantly. / Les nombres suivis de lettres différentes diffèrent de façon significative.

Table II. Chemical composition of *Terminalia arjuna* leaf under different treatments.Tableau II. Composition chimique de la feuille de *Terminalia arjuna* sous différents traitements.

S1. No.	Treatment	Moisture	Crude protein	Total carbohydrate	Crude fibre	Total minerals
S1 No.	Traitement	Humidité	Protéine brute	Hydrates de carbone totaux	Fibre brute	Minéraux totaux
T1	N1P1K1	70.37 d	11.56 g	14.67 cd	12.70 a	6.78 d
T2	N1P2K2	70.57 d	11.67 fg	14.70 cd	12.70 a	6.80 d
T3	N1P3K3	70.60 cd	11.88 f	14.77 cd	12.67 a	6.80 d
T4	N2P1K1	70.90 bc	12.81 e	14.93 bcd	12.60 a	7.07 c
T5	N2P2K2	70.97 b	13.13 d	15.03 abc	12.63 a	7.11 c
T6	N2P3K3	71.01 b	13.13 d	15.03 abc	12.53 a	7.12 c
T7	N3P1K1	71.40 a	14.68 c	15.17 abc	12.51 a	7.41 b
T8	N3P2K2	71.67 a	15.31 a	15.50 a	12.43 a	7.52 a
T9	N3P3K3	71.44 a	15.31 a	15.33 ab	12.43 a	7.49 ab
T10	N4P1K1	71.53 a	15.00 b	15.30 ab	12.57 a	7.43 b
T11	N4P2K2	71.63 a	15.31 a	15.40 ab	12.57 a	7.50 a
T12	N4P3K3	71.60 a	15.31 a	15.43 ab	12.50 a	7.50 a
T13	N0P0K0	69.67 c	10.63 h	14.50 d	12.93 a	6.46 c
Control / Témoin						
	S.Em ±	0.11	0.10	0.18	0.11	0.03
	Ecart type					
	'F' test	***	***	***	NS	***
	CD at 5% level	0.30	0.28	0.50	—	0.08

NS denotes not significant / NS veut dire non significatif. *** Significant at 0.1% level / *** Significatif à 0,1 %. Figures with different alphabets differ significantly / Les nombres suivis de lettres différentes diffèrent de façon significative. Average values are based on two years data / Les valeurs moyennes sont basées sur deux années de données. Percentage values are on oven dry basis / Les valeurs en pourcentage sont basées sur des feuilles séchées au four.

Effect of different treatments on the economic characters of *A. mylitta* are presented in Table III. It is evident from Table III that feeding the silkworms with leaves grown under NPK fertilization significantly increased the full grown larval weight, effective rate of rearing, cocoon weight, shell weight and silkworm ratio (%). The nitrogen is a component of the bases purines and pyrimidines, important constituents of the nucleic acids which ultimately are responsible for protein synthesis and silk being a protein fibre needs the same all the more. The phosphorus is stated to be a cinderella compound and the nucleic acids which are responsible for synthesis of silk, a protein material containing 9% phosphorus (Asimov, 1962). Similarly insect body requires potassium for its proper development and normal functioning. In the silkworm plasma potassium is a major inorganic component (Imms, 1963). All these factors might be responsible for increase in larval weight, cocoon weight, shell weight and SR (%). Sidhu *et al.* (1969) have also observed that leaves grown under nitrogen, phosphorus and potash fertilization improves the larval growth, cocoon yield and other economic characters. Increase in ERR may be due to the improvement in the quality of leaves (Table II) and the quality of leaves has got direct influence on the health, growth and survival of silkworms (Sinha *et al.*, 1986).

Table III. Effect of different treatments on the economic characters of *A. mylitta*.Tableau III. Effet de différents traitements sur les caractères économiques de *A. mylitta*.

S1 No.	Treatment	Larval weight (g)	E. R. R. (%)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	S. R. (%)
S1. No.	Traitement	Poids larvaire (g)	Taux effectif d'élevage (%)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)
1.	N1P1K1	37.90 d	50.20 d	12.00 c	1.77 e	14.71 b
2.	N1P2K2	38.05 d	50.50 d	12.10 de	1.79 de	14.75 b
3.	N1P3K3	38.15 d	50.83 d	12.10 de	1.79 de	14.74 b
4.	N2P1K1	39.20 c	52.10 c	12.35 cd	1.83 de	14.81 b
5.	N2P2K2	39.30 c	52.33 c	12.45 c	1.85 de	14.82 b
6.	N2P3K3	39.45 c	52.83 c	12.55 c	1.86 cd	14.86 b
7.	N3P1K1	40.75 b	54.20 b	13.00 b	1.94 bc	14.93 b
8.	N3P2K2	41.75 a	56.44 a	13.93 a	2.17 a	15.54 a
9.	N3P3K3	41.55 a	55.83 a	13.85 a	2.13 a	15.38 a
10.	N4P1K1	41.05 b	54.50 b	13.55 b	2.02 b	14.95 b
11.	N4P2K2	41.65 a	56.33 a	13.93 a	2.17 a	15.54 a
12.	N4P3K3	41.75 a	56.00 a	13.90 a	2.15 a	15.43 a
13.	N0P0K0 (Control)/(Témoin)	36.50 e	49.00 e	11.42 f	1.63 f	14.23 c
S.Em ±		0.16	0.42	0.09	0.031	0.16
Ecart type						
'F' test		**	***	***	***	***
CD at 5% level		0.44	1.18	0.26	0.08	0.31

N. B. ** Significant at 0.1% level / ** Significatif à 0,1 % ; *** Significant at 0.1% level / *** Significatif à 0,1 %.

Figures with different alphabets differ significantly / Les nombres suivis de lettres différentes diffèrent de façon significative.

Average values are based on two years data / Les valeurs moyennes sont basées sur deux ans de données.

Treatment T1, T2 and T3 behave equally in respect of ERR, larval and cocoon weight. Treatments T4, T5 and T6 also do not differ significantly among themselves in respect of ERR, larval and cocoon weight. Further, treatments T8, T9, T11 and T12 behave equally in respect of larval weight, ERR, cocoon weight, shell weight and SR (%) and are far superior as compared to all other treatments including control.

Data in Table IV indicate the scores allotted to thirteen different treatments of NPK under study for leaf yield, chemical constituents and economic characters by the method of Arunachalam and Bandyopadhyay (1984) where lower values signified higher ranking. It is evident from this table that among different combinations of NPK treatment N3P2K2 i. e. application of NPK = 150: 50: 50 kg/ha/yr is the best combination which is further confirmed by the economics of fertilizers application in *T. arjuna* farm (Table V). In this treatment net profit was Rs.14019/- per ha. per crop and profit over control was Rs.6919/- per ha. per crop which is higher than any other treatment.

Table IV. Scores allotted to thirteen different treatments of NPK for leaf yield chemical constituents and economic characters.

Tableau IV. Scores obtenus pour les treize traitements différents de NPK pour les composants chimiques du rendement en feuilles et les caractères économiques.

Sl. No.	Treatment	Leaf yield	Chemical constituents					Economic characters					Total scores & ranks
			Moisture	Crude protein	Total carbohydrate	Crude fibre	Total minerals	Larval weight	E. R. R.	Cocoon weight	Shell weight	Silk ratio (SR)	
			<i>Composants chimiques</i>					<i>Caractères économiques</i>					
	<i>Traite-ment</i>	<i>Rendement en feuilles</i>	<i>Humidité</i>	<i>Protéines brutes</i>	<i>Hydrates de carbone totaux</i>	<i>Fibre brute</i>	<i>Minéraux totaux</i>	<i>Poids larvaire</i>	<i>Taux effectif d'élevage</i>	<i>Poids du cocon</i>	<i>Poids de la coque</i>	<i>Richesse soyeuse (SR)</i>	<i>Total des résultats & classements</i>
T8	N3P2K2	0.17	0.20	0.13	0.25	1.00	0.20	0.20	0.20	0.17	0.17	0.33	3.02(I)
T11	N4P2K2	0.17	0.20	0.13	0.38	1.00	0.20	0.20	0.20	0.17	0.17	0.33	3.15(II)
T12	N4P3K3	0.17	0.20	0.13	0.38	1.00	0.20	0.20	0.20	0.17	0.17	0.33	3.15(II)
T9	N3P3K3	0.17	0.20	0.13	0.38	1.00	0.30	0.20	0.20	0.17	0.17	0.33	3.25(III)
T10	N4P1K1	0.17	0.20	0.25	0.38	1.00	0.40	0.40	0.40	0.33	0.33	0.67	4.53(IV)
T7	N3P1K1	0.33	0.20	0.38	0.50	1.00	0.40	0.40	0.40	0.33	0.50	0.67	5.11(V)
T6	N2P3K3	0.50	0.40	0.50	0.50	1.00	0.60	0.60	0.60	0.50	0.58	0.67	6.45(VI)
T5	N2P2K2	0.50	0.40	0.50	0.50	1.00	0.60	0.60	0.60	0.50	0.75	0.67	6.62(VII)
T4	N2P1K1	0.58	0.50	0.63	0.75	1.00	0.60	0.60	0.60	0.58	0.75	0.67	7.26(VIII)
T3	N1P3K3	0.75	0.70	0.75	0.88	1.00	0.80	0.80	0.80	0.75	0.75	0.67	8.65(IX)
T2	N1P2K2	0.83	0.80	0.81	0.88	1.00	0.80	0.80	0.80	0.75	0.75	0.67	8.89(X)
T1	N1P1K1	0.83	0.80	0.88	0.88	1.00	0.80	0.80	0.80	0.83	0.83	0.67	9.12(XI)
T13	N0P0K0 (Control) (Témoin)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	11.00(XII)

Table V. Economies of fertilizers application in *T. arjuna* farm (ha/crop).Tableau V. Résultats économiques des applications d'engrais sur *T. arjuna* (ha / culture)

Expenditure												
Sl. No.	Treatment	Percentage increase in leaf yield over control (%)	No. of dfls which can be reared	Cultural operations cost (Rs.) (Application of FYM, weeding and other misce. expend).	Cost of fertilizers (Rs.)	Cost of dfls (Rs.)	Cost of labours (Rs.) (3 persons for 50 days @ 58/- per labour / day)	Total expenditure (Rs.) (A)	Cocoons harvested @ 45 cocoons per dfl.	Income from cocoon harvested @ Re.1/- per cocoon (Rs.) (B)	Net profit (B-A) (Rs.)	Profit over control (Rs.)
Dépenses												
Sl. No.	Traitement	Augmentation du rendement en feuilles par rapport aux témoins (%)	Nb. de pontes qui peuvent être élevées	Coût des travaux de culture (Rs.) (Application de fumier, désher-bants et autres dépenses diverses)	Coût des engrais (Rs.)	Coût des pontes (Rs.)	Coût des travaux (Rs.) (3 personnes pdt 50 jours @58/- par travailleur par jour)	Dépense totale (Rs.) (A)	Récolte des cocons @ 45 cocons par dfl.	Revenu de la récolte des cocons @ Re.1/- par cocoon (Rs.) (B)	Bénéfice net (B - A) (Rs.)	Bénéfice par rapport aux témoins (Rs.)
T1	N1P1K1	8.01	486	4000	904	486	8700	14090	21870	21870	7780	680
T2	N1P2K2	9.16	491	4000	1398	491	8700	14589	22095	22095	7506	406
T3	N1P3K3	10.21	496	4000	1895	496	8700	15091	22320	22320	7229	129
T4	N2P1K1	14.26	514	4000	1317	514	8700	14531	23130	23130	8599	1499
T5	N2P2K2	15.49	520	4000	1811	520	8700	15031	23400	23400	8369	1269
T6	N2P3K3	16.20	523	4000	2308	523	8700	15531	23535	23535	8004	904
T7	N3P1K1	38.85	625	4000	1729	625	8700	15054	28125	28125	13071	5971
T8	N3P2K2	47.62	664	4000	2497	664	8700	15861	29880	29880	14019	6919
T9	N3P3K3	47.35	663	4000	2720	663	8700	16083	29835	29835	13752	6652
T10	N4P1K1	44.81	652	4000	2141	652	8700	15493	29340	29340	13847	6747
T11	N4P2K2	47.62	664	4000	2911	664	8700	16275	29880	29880	13605	6505
T12	N4P3K3	47.62	664	4000	3132	664	8700	16496	29880	29880	13384	6284
T13	N0P0K0	—	450	4000	—	450	8700	13150	20250	20250	7100	—
Control / Témoin												

Urea (46%) / Urée (46 %) - Rs. 3.80/kg, S. S. P. (23% P) - Rs. 2.90/kg, MOP (60% K) - Rs. 4.30/kg

It is therefore inferred that among the all combinations of NPK under study the combination N3P2K2 i. e. application of NPK = 150: 50: 50 kg/ha/yr. is the best not only for the leaf yield and quality of *T. arjuna* but from economical point of view also.

REFERENCES

- ARUNACHALAM V. and BANDYOPADHYAY A. (1984) A method to make decisions jointly on a number of dependent characters. *Indian J. Genet.*, 44 (3): 419 - 424.
- ASIMOV I. (1962) Genetic code, Orion Press, New York, 3.
- AOAC (1950) Official and tentative methods of analysis, 7th edition, Washington.
- GUPTA Y. P. and DAS N. B. (1962) Nutritive value of maize as influenced by manures and fertilizers - chemical composition. *Ind. J. Agri. Sci.*, 32 (1): 79 - 89.
- IMMS A. D. (1963) A general test book of Entomology, Asia Publishing House, Bombay.
- JOLLY M. S., CHATURVEDI S. N. and PRASAD S. (1968) A survey of tasar crops in India, *Indian J. Seric.*, 7 (1): 56 - 57.
- JOLLY M. S., SEN S. K. and AHSAN M. M. (1974) *Tasar culture*, Ambika Publishers, Bombay.
- KASIVISWANATHAN K. and SITARAMA IYENGAR M. N. (1965) Preliminary observations on the varietal - cum - irrigational response to different 'N' levels on the seasonal and total yield of mulberry. *Indian J. Seric.*, IV, 22 - 33.
- KASIVISWANATHAN K. and SITARAMA IYENGAR M. N. (1966) Effect of NPK manuring on the seasonal and total yield of mulberry. *ibid.* 1: 46 - 51.
- KASIVISWANATHAN K. and SITARAMA IYENGAR M. N. (1969) Varietal - cum - irrigational response to different 'N' levels on the seasonal and total yield of mulberry *S. I. B.* 1 (1): 1 - 12.
- KASIVISWANATHAN K. and SITARAMA IYENGAR M. N. (1970) Effect of plant densities methods of leaf harvests and nitrogen fertilization on the leaf yield of irrigated mulberry in Mysore state. *Indian J. Seric.*, 9 (1): 41 - 48.
- PAIN A. K. (1965) Effect of NPK fertilizers and their combinations on the yield and nutritive value of mulberry. *Indian J. Seric.*, 4 (1): 1 - 8.
- PIPER C. S. (1950) *Soil and plant analysis*. University of Adelaide, Australia.
- RAY D., MONDAL L. N., PAIN A. K. and MONDAL S. K. (1973) Effect of NPK and farmyard manure on the yield and nutritive values of mulberry leaf. *Indian J. Seric.*, 12 (1): 7 - 12.
- SIDHU N. S., KASIVISWANATHAN K. and SITARAMA IYENGAR M. N. (1969) Effect of feeding leaves grown under NPK fertilization on the larval development and cocoon characters of *B. mori* L. *Indian J. Seric.*, 8: 55 - 60.
- SINHA A. K., CHOUDHARY S. K., BRAHMACHARI B. N. and SENGUPTA K. (1986) Foliar constituents of the food plants of temperate tasar silkworm *Antheraea proylei*, *Indian J. Seric.*, 25 (1): 42 - 43.

EFFET DE DIFFERENTES COMBINAISONS D'AZOTE, DE PHOSPHORE ET DE POTASSIUM (NPK) SUR LE RENDEMENT ET LA VALEUR NUTRITIVE DE *TERMINALIA ARJUNA*

U. S. P. SINHA, Md. ISA, D. P. SRIVASTAVA*, A. K. SINHA & B. N. BRAHMACHARI

Central Tasar Research & Training Institute, P. O. Piska Nagri, Dist. - Ranchi (Bihar), Inde.

Des études sur l'effet de treize combinaisons différentes de NPK sur la qualité et le rendement en feuilles de Terminalia arjuna, dont les plants sont espacés de 1,2 m × 1,2 m, révélèrent que la combinaison de N : P : K = 150 : 50 : 50 kg par ha et par an, était la meilleure d'entre toutes. L'application de cette combinaison donne une augmentation de 47,62 % du rendement en feuilles par rapport aux témoins. Les résultats des essais chimiques et biologiques confirment également une amélioration significative de la qualité des feuilles par l'application de la combinaison N150 : P50 : K50. Par ailleurs, la combinaison mentionnée ci-dessus donne les meilleurs bénéfices parmi tous les traitements qui ont fait l'objet d'études de rentabilité.

INTRODUCTION

Terminalia arjuna est l'une des nourritures de base du ver à soie tropical tasar *Antheraea mylitta* Drury (Jolly et coll., 1968). La plante se présente sous forme d'arbre et on la trouve couramment sur les berges des fleuves et des ruisseaux de l'Inde centrale. Sous la direction de l'*Inter State Tasar Project*, une plantation extensive a été mise en place avec cette plante afin d'évaluer l'élevage du tasar, en parallèle avec l'élevage traditionnel en forêt. Sa culture continue dans le même champ, année après année diminue la fertilité du sol. Une fertilisation équilibrée est l'un des moyens les plus rapides et les plus économiques de pallier ces pertes. Le rôle de l'azote, du phosphore et du potassium pour la nutrition et le métabolisme des plantes est bien connu. Il existe suffisamment de rapports sur les effets de la fertilisation sur le rendement en feuilles chez le mûrier (Kasiviswanathan & Iyengar, 1965, 1966, 1969, 1970 ; Pain, 1965). Cependant, aucune étude méthodique n'a été entreprise jusqu'à ce jour sur l'effet des fertilisants sur les nourritures végétales du tasar. L'article actuel décrit l'effet de différentes combinaisons de fertilisants NPK sur les caractéristiques qualitatives et quantitatives des feuilles de *T. arjuna*.

MATERIELS ET METHODES

L'expérience a été menée dans le champ expérimental du *Central Tasar Research and Training Institute*, Nagri, Ranchi sur une plantation de *Terminalia arjuna*, dont les plants sont espacés de 1,2 m × 1,2 m et sont arrosés par la pluie. Le gradient de fertilité du champ a été étudié avant la mise en place de l'expérience et il a été observé que le champ était assez uniforme. En ce qui concerne la composition du sol, elle était constituée de latérite sablonneuse au pH de 5,5, de 0,337 % de carbone organique, avec 34,409 kg / ha de phosphore disponible (P₂₀₅) et 80,640 kg / ha de potassium

* Central Silk Board, Bangalore, Inde.

disponible (K_{20}). L'analyse chimique du sol fut réalisée grâce à la méthode de Piper (1950). N, P et K ont été appliqués respectivement sous la forme d'urée, de super phosphate simple et de muriate de potasse. L'engrais azoté a été appliqué en trois doses égales pendant les mois de juin, juillet et août. Les engrais phosphorés et potassiques ont été appliqués en une seule dose pendant le mois de juin. En complément, du fumier a été appliqué à raison de 6 T / ha, chaque année au cours du mois de juin en plus de la dose basique de NPK. L'expérience a été conduite en blocs aléatoires avec trois répétitions de treize traitements. Pour chacune des répétitions, 36 plants ont été conservés. Les traitements sont constitués de cinq niveaux d'azote et de quatre niveaux de phosphore et de potassium.

N0 = 0 kg N/ha/yr.	P0 = 0 kg P/ha/yr.	K0 = 0 kg K/ha/yr.
N1 = 50 kg N/ha/yr.	P1 = 25 kg P/ha/yr.	K1 = 25 kg K/ha/yr.
N2 = 100 kg N/ha/yr.	P2 = 50 kg P/ha/yr.	K2 = 50 kg K/ha/yr.
N3 = 150 kg N/ha/yr.	P3 = 75 kg P/ha/yr.	K3 = 75 kg K/ha/yr.
N4 = 200 kg N/ha/yr.		

Les treize traitements sont les suivants :

T1 : N1P1K1, T2 : N1P2K2, T3 : N1P3K3, T4 : N2P1K1, T5 : N2P2K2, T6 : N2P3K3, T7 : N3P1K1, T8 : N3P2K2, T9 : N3P3K3, T10 : N4P1K1, T11 : N4P2K2, T12 : N4P3K3, T13 : N0P0K0.

La méthode d'échantillonnage aléatoire simple a été suivie afin de collecter les échantillons destinés à l'étude sous référence. Des échantillons de feuilles ont été cueillis 45 jours après l'application de fertilisants dans le champ, exceptées les feuilles trop tendres ou trop mûres, provenant de toutes les parcelles et de tous les traitements. Les constituants chimiques tels que l'humidité, les minéraux, la fibre brute et les hydrates de carbone totaux ont été estimés selon la méthode de A. O. A. C. (1950). La teneur en azote a été estimée selon la méthode de Kjeldahl et la quantité de protéines brutes a été calculée en multipliant la valeur estimée de la teneur en azote par 6,25.

Afin d'évaluer l'effet nutritionnel, des pontes saines de *A. mylitta* ont été levées et élevées en trois répétitions de 100 vers chacune, selon les techniques d'élevage de Jolly et coll. (1974) pendant la deuxième récolte (sept. - nov.). La méthode suggérée par Arumachalam et Bandyopadhyay (1984) a été suivie afin de décider du classement des différents traitements de NPK à l'étude pour différents paramètres.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le rendement total en feuilles sur trois années ainsi que la moyenne groupée sont donnés dans le Tableau I. Les résultats indiquent que l'effet dû aux différentes combinaisons de NPK est hautement significatif pour toutes les années. Ceci corrobore les études de Pain (1965) qui rapporta également que le rendement le plus important en feuilles de mûrier est obtenu grâce aux combinaisons de NPK. Parmi les différentes doses d'azote qui furent essayées, à savoir 0, 50, 100, 150 et 200 kg N / ha, aucune différence significative du rendement ne fut observée entre 150 et 200 kg N / ha pour les trois années. Kasiviswanathan et Iyengar (1965) ne trouvèrent aucune différence significative du rendement en feuilles de mûrier entre 100, 150 et 200 kg N / ha pour trois des récoltes saisonnières sur cinq. L'effet des fertilisants potassiques et phosphatés, n'a pas été aussi marqué que celui de l'azote sur les rendements en feuilles de *T. arjuna*, bien qu'ils aient contribué à l'augmentation des rendements. Les traitements T1, T2 et T3 ne diffèrent pas entre eux de façon significative. De manière similaire, les traitements T4, T5 et T6 sont à égalité. Il n'y eut aucune différence significative dans le rendement en feuilles parmi les traitements T8, T9, T10, T11 et T12. L'augmentation du rendement en feuilles fut la plus élevée (par rapport aux témoins 47,62 %), avec les traitements T8 (37 603,89), T11 (37 603,78) et T12 (37 603,89) kg par ha. Parmi ces traitements, T8, à savoir N₃P₂K₂, peut être

considéré comme le meilleur parce qu'avec celui-ci, des doses moindres de fertilisants ont été appliquées.

Le Tableau II décrit la composition chimique moyenne des feuilles de *T. arjuna* sous différents traitements. Il est évident d'après le Tableau II que l'application de NPK a amélioré la qualité des feuilles. A l'exception de la fibre brute, les teneurs en humidité, en protéines brutes, en hydrates de carbone totaux et en minéraux totaux, sont significativement plus élevées chez les plants traités que chez les témoins. Cette observation actuelle soutient les travaux de Ray et coll. (1973) qui rapportèrent également l'effet significatif des niveaux d'azote sur l'humidité, les protéines brutes et les teneurs en minéraux totaux. Gupta et Das (1962) observèrent l'effet des applications de NPK sur la teneur en protéines brutes du maïs. Pain (1965) remarqua que l'application de NPK augmente de façon significative les teneurs en humidité, en protéines brutes et en hydrates de carbone totaux de la feuille de mûrier. Il ne remarqua pas non plus de différence significative dans la teneur en fibre brute.

La teneur en humidité des traitements T7, T8, T9, T10, T11 et T12 est la plus élevée et ne diffère pas de manière significative entre les traitements. Les traitements T4, T5 et T6 se comportèrent de manière identique et sont placés dans le deuxième groupe par ordre décroissant pour la teneur en humidité. Les traitements T1, T2 et T3 se situent au troisième niveau le plus bas. En outre, les traitements T8, T9, T11 et T12 se comportèrent de manière identique en ce qui concerne les teneurs en protéines brutes, en hydrates de carbone totaux et en minéraux et sont largement supérieurs par rapport aux témoins.

Les effets des différents traitements sur les caractéristiques économiques de *A. mylitta* sont présentés dans le Tableau III. Il est évident d'après le Tableau III que nourrir les vers à soie de feuilles cultivées avec les engrais NPK, augmente de façon significative le poids de la larve arrivée à maturité, le taux effectif d'élevage, le poids du cocon, de la coque et la richesse soyeuse (%). L'azote est un composant des bases purines et pyrimidines, qui sont d'importants constituants des acides nucléiques eux-mêmes fondamentalement responsables de la synthèse des protéines ; la soie étant une fibre protéinique, elle en a donc d'autant plus besoin. Le phosphore est reconnu comme composé pauvre et les acides nucléiques qui sont responsables de la synthèse de la soie, comme matériau protéinique contenant 9 % de phosphore (Asimov, 1962). En outre, le corps de l'insecte nécessite du potassium pour se développer de façon satisfaisante. Dans le plasma du ver à soie, le potassium est un composant inorganique majeur (Imms, 1963). Tous ces facteurs semblent être responsables de l'augmentation du poids de la larve, du cocon, de la coque et de la richesse soyeuse (%). Sidhu et coll. (1969) ont également observé que des feuilles cultivées avec une fertilisation à base d'azote, de phosphore et de potassium augmentait la croissance larvaire, le rendement en cocons ainsi que d'autres caractéristiques économiques. L'augmentation du taux effectif d'élevage (ERR) semble être due à l'amélioration de la qualité des feuilles (Tableau II), qui a une influence directe sur la santé, la croissance et le taux de survie des vers à soie (Sinha et coll., 1986).

Les traitements T1, T2 et T3 donnent des résultats identiques, en ce qui concerne les ERR, les poids de la larve et du cocon. Les traitements T4, T5 et T6 ne diffèrent pas non plus entre eux de manière significative en ce qui concerne les ERR, les poids de la larve et du cocon. En outre, les traitements T8, T9, T11 et T12 se comportent de manière identique en ce qui concerne le poids larvaire, l'ERR, le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse (%) et sont bien supérieurs lorsqu'on les compare aux autres traitements y compris les témoins.

Les données du Tableau IV donnent les résultats respectifs aux treize traitements différents de NPK à l'étude pour le rendement en feuilles, les constituants chimiques et les caractéristiques économiques, par la méthode d'Arunachalam et Bandyopadhyay (1984). Dans ce tableau, les valeurs les plus basses signifient un classement plus élevé. Il est clair d'après ce tableau que sur tous les traitements, le traitement $N_3P_2K_2$, à savoir une application de NPK = 150 : 50 : 50 kg / ha / an est la meilleure combinaison, ce qui est par ailleurs confirmé par les résultats économiques des applications d'engrais pour la culture de *T. arjuna* (Tableau V). Avec ce traitement, le bénéfice net était de Rs

14 019 / - par hectare et par culture et le bénéfice par rapport aux témoins fut Rs. 6919 / - par ha et par culture ce qui est plus élevé qu'avec tout autre traitement.

C'est pourquoi, il est induit que sur toutes les combinaisons, la $N_3P_2K_2$, c'est à dire celle dont les valeurs de NPK sont respectivement de 150 : 50 : 50 kg / ha / an est la meilleure, non seulement pour le rendement en feuilles et la qualité de *T. arjuna*, mais également d'un point de vue économique.

LIPID CONTENT OF MUGA WORM, *ANTHRAEA ASSAMA* WESTWOOD : IMPACT OF PHOTOPERIOD AND INSECTICIDES

D. S. BORA & R. HANDIQUE

Department of Life Sciences, Dibrugarh University, Dibrugarh - 786 004, Assam, India.

Anthraea assama when reared in long day (9D: 15L) and short day (18D: 6L) conditions, in short day regime the total content enhanced in early instars followed by a greater lipid accumulation in pupa. When an early larval stage was exposed to OP compound insecticides (malathion and phosphamidon), a delayed response was marked by decline of total lipid level in 15hL regime while in 6hL regime, the toxic effect was expressed immediately.

INTRODUCTION

Literature reveals that the nutritional content of food plant largely determines the growth, development and silk yield of sericogenic insects (Prasad, 1993). Success with muga worms have not been achieved as yet regarding artificial diet and therefore the nutritional requirements of these worms are not fully known. On the other hand, adults of *Anthraea assama* are non - feeding and their reproductive efficiency is under the control of nutritional level of developing larvae. Muga worms are reported to be susceptible to insecticidal action (Bora and Handique, 1996) and is victimized as a non - target species. In Assam, constant burning of low pressure gas by oil industries is changing the photoperiod and thermoperiod of the neighbouring areas and reports are pouring in about pollution effect on muga population whose larval stages are reared in outdoor condition on plants (Barua *et al.*, 1992). There is controversy regarding the toxicity of insecticides in the environment as they may undergo biotransformation by microbes, plants, animal body or they may undergo photochemical transformation under earth's natural photoperiod and thermoperiod. Chukwudebe *et al.*, (1989) reported that several phosphorothioate insecticides on exposure to sunlight or UV light are converted to compounds having delayed toxic effects. Within controlled conditions of laboratory where artificial photoperiod is maintained under bulb, the UV portion of natural sunlight is lacking. Whether such light will show differential pesticidal action is not clearly understood. Thus the present study has been taken up with a view to assess the biochemical changes (lipid) and their relationship with photodecomposition of sublethal dosages of organophosphorus insecticides, malathion and phosphamidon, under indoor rearing conditions.

MATERIALS AND METHODS

The disease free layings of *Anthraea assama* were collected from a Government sericultural farm in Tingrai, Assam and rearing was conducted in indoor condition by Bora and Handique (1994). Two photoperiodic regimes were maintained with 95.0 - 97.0 lx of light intensity for 9D: 15L (control) regime and 21.5 - 23.0 lx for 18 D: 6L regime. The temperature and relative humidity during photophase was 22 - 32° C and 85 - 56% respectively and during scotophase was 32 - 26° C and 56 - 81% respectively. A sublethal dose (LD₄₀) of malathion (141 ppm) and phosphamidon (123 ppm)

(Bora, 1998) was applied to early third instar larvae by feeding with treated leaves of *Machilus bombycina*. Different developmental stages were sacrificed at late third, early fourth, late fourth, early fifth, late fifth, early pupa, late pupa and adult.

Collection of material :

Regarding time of collecting the insects, early is meant to indicate the day just after a moult and late means the day just before the next moult in case of larval stage. In case of pupa, early means the first day of pupal stage and late means the eighteenth day which is the last day of pupal duration in control insects. For each sample 15 larvae were collected at random and sacrificed for analysis in three groups.

Lipid extraction :

The fresh insect body was killed by using chloroform, washed with distilled water and dried on a filter paper. Killing of all insects were done at 8.00 - 9.00 am and homogenized with a Potter elvehjen homogeniser fitted with teflon pestle in distilled water. Total lipid was extracted with a mixture of chloroform: methanol (2: 1) and estimated by Bligh and Dyar method (Jayaraman, 1985). As fresh weight was taken immediately before and after moult the gut was free of any food material and hence gut content was not included in total lipid.

The data were statistically analysed by two way analysis of variance and critical difference was computed as plotted in Table I.

RESULTS AND DISCUSSION

The results are summarized in Fig. 1 (a - e) and Table I.

Variations in total lipid during metamorphosis in *Antheraea assama* showed, larvae reared in 9D : 15L photoperiod accumulated increased amount of lipid with growing age till late fifth instar. Such age related increase in total lipid was also recorded in other insects (Rao and Agarwal, 1970).

Essential oils and fatty acids of *Machilus bombycina* are reported to influence food selection by muga worms (Hazari *et al.*, 1995). The lipid and fatty acid content of 'som' plants has been reported to be less in tender leaves (Unni *et al.*, 1996) and hence the switching over to mature leaves by older larvae may have relationship with the increased lipid content in their bodies. The lipid which is required for structural and functional growth (Blum, 1985) and kept as a reserved source of energy is also obtained through interconversion of protein and carbohydrates. The period of moult is a non feeding stage and therefore soon after moulting the total lipid decreases (Prasad *et al.*, 1986, 1987 ; Shapiro *et al.* 1988, Rockstein, 1978).

During pupal period, the total lipid content was higher than that of larva and there was a fall from early pupa to late pupa. Studies in the laboratory on the protein content of muga worms has shown (Bora, 1998) that the protein and amino acids are required in lepidopterans for imaginal tissue formation (Chapman, 1978) and therefore part of the lipids may be converted to maintain the titre of these compounds. Literatures also reveal low RQ for lepidopteran pupa (Wigglesworth, 1972) and also U - shaped curve for respiratory metabolism in *Bombyx mori* (Tazima, 1978) which might indicate a possibility for use of lipid as a substrate of energy in the nonfeeding pupal stage of *Antheraea assama*.

Total lipid exhibited sexual dimorphism and males always contain higher lipid content than females. This has also been reported in *Bombyx mori* (Chinya and Ray, 1976). The male adults in *Antheraea assama*, being an active flier to follow the sex pheromone released by frail and lethargic females require extra energy and increase of total lipid in adult male may be a preparatory step for the purpose, as lipid is a better substrate for insect flight (Downer, 1978).

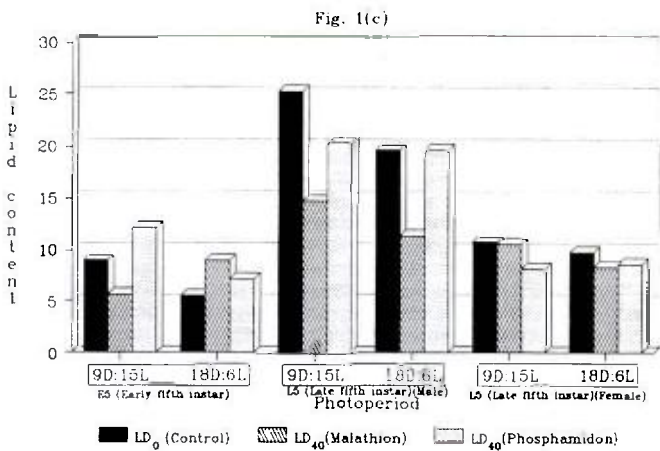
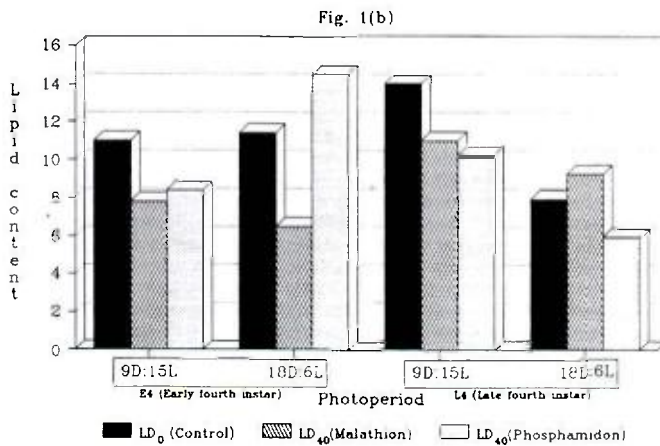
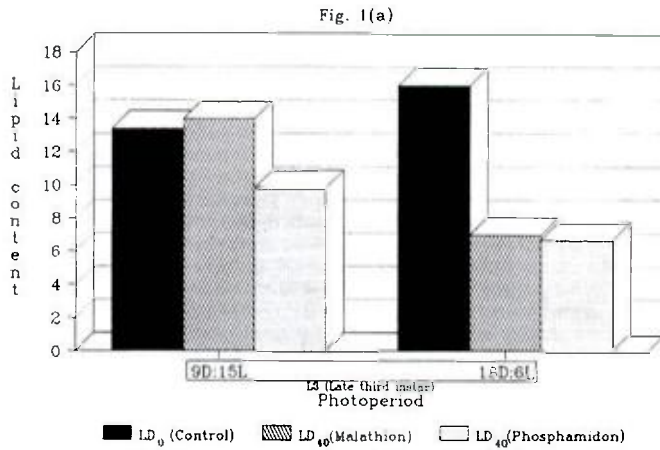


Fig 1. Impact of photoperiod and insecticide on total lipid content (mg/g) in *Antheraea assama*.

Fig1. Impact de la photopériode et des insecticides sur la teneur totale en lipides (mg/g) chez *Antheraea assama*.

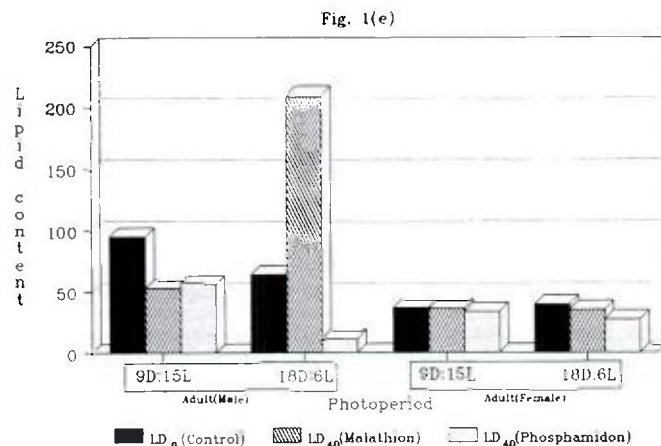
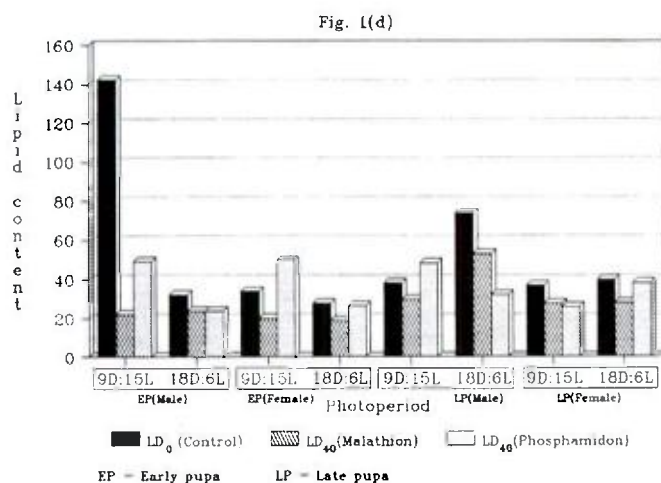


Fig 1. Impact of photoperiod and insecticide on total lipid content (mg/g) in *Antheraea assama*.

Fig1. Impact de la photopériode et des insecticides sur la teneur totale en lipides (mg/g) chez *Antheraea assama*.

Impact of photoperiod on lipid content :

While compared to the lipid content of larvae in 9D : 15L regime, in short day condition (18D : 6L) in late third instar, the lipid content was increased whereas from late fourth till spinning it decreased as shown in Fig. 1a - 1c. This may reflect enhanced accumulation of lipid in early larval feeding stage in short day. In insect, the circadian rhythmicity displayed by corpus cardiacum and brain neurosecretory cells may influence diel changes in feeding and biocomponent rhythm, since the titre of various hormones also vary rhythmically across the day (Beck, 1980 ; George and Muraleedharan, 1990). However, no conclusion can be derived as the circadian rhythm of Neurosecretory cells in *A. assama* has not been studied so far.

During pupal stage in 9D: 15L while there was decline of total lipid from early pupa to late pupa there was 2.29 fold increase in male and 1.44 fold increase in female in 18D: 6L regime. Such accumulation of lipid in pupal stage in short day condition may indicate a diapausing character as lipid is required in non-feeding diapausing stage (Turunen and Chippendale, 1981). Although in our present study diapause could not be induced in *A. assama* our result may indicate a potentiality in *A. assama* for undergoing diapause in short day condition (Fig. 1a).

Influence of malathion on lipid content:

In 9D: 15L regime, total lipid content did not show significant change when fed with LD₄₀ dose of malathion treated leaves immediately. The insecticides ingested orally may be slow to react because of slower absorption. It has also been suggested that anticholinesterases could interact to cause modifications in the gastric absorption of various materials through their stimulatory effects on the parasympathetic system and consequent action on peristaltic motility (Wilkinson, 1976). The delayed effect was seen in late fourth and late fifth (male) instars, where total lipid was reduced (Fig. 1a - 1c). Insecticides applied to target organisms in the environment may enter the insect body through the integument or spiracular opening directly or may enter through oral ingestion. During the penetration and distribution process some of the insecticides may be picked up by the insects through haemocytes and stored in the haemocytes or body tissue e. g. adipose tissue and become biologically unavailable (Saxena, 1990; Begum and Gohain, 1996), thus delaying the effect. Malathion is also converted enzymatically to more toxic malaaxon in the insect body.

OP compound toxicity increases O₂ consumption and thus increased metabolic rate is observed (Lohar and Wright, 1992) and this could lead to lipid depletion for meeting extra energy demand.

Similarly after larva - pupa metamorphosis, in both early and late pupa and adults, malathion caused depletion of total lipid, in 9D: 15L regime (Fig. 1d - 1e). Such decrease may be considered as a sign of toxicity and this agrees with toxicity tests conducted by other authors. Lohar and Wright (1993) found that malathion reduced total lipid in haemolymph, fat body and oocytes.

Impact of malathion and photoperiod :

In 18D: 6L regime while malathion was applied at LD₄₀ dose and the surviving larvae were grown till adult, the total lipid decreased significantly in late third instar followed by insignificant variation till early fifth instar which then again decreased in late fifth (male) instar in comparison to untreated control (Fig. 1a - 1c).

The transient decrease in late third instar occurred for being used in meeting the extra energy demand. A comparative look shows that the response to malathion was delayed in 9D: 15L, while it was expressed immediately after the treatment was withdrawn (late third instar) in 18D: 6L regime. This probably confirms the view of Chukwudebe *et al.* (1989) that sunlight converts malathion into a compound having delayed toxic action.

In adult male in *A. assama*, there was a sharp increase of total body lipid after eclosion while in female adult, variation was not significant in comparison to untreated control in 6hL. This may indicate less expenditure of energy in male although increased accumulation took place, but it was also observed under 9D: 15L regime.

Influence of phosphamidon on lipid content :

In 9D: 15L photoperiod, when phosphamidon was applied at LD₄₀ dose, Fig. 1e shows a significant depletion in late fifth instar female in comparison to untreated control. Such a delayed decrease may indicate a similar mode of action of phosphamidon with malathion as discussed earlier except that with phosphamidon the time of overt expression was further delayed than with malathion treatment. Similarly in late developmental stages there was depletion of total lipid in comparison to untreated control and resembled malathion's mode of action.

**Table I. Age related variation in impact of photoperiod and insecticide on *Antheraea assama* total lipid (mg / g of wet weight).
Tableau I. Variation selon l'âge de l'impact de la photopériode et des insecticides sur les lipides totaux d'*Antheraea assama* (mg / g poids frais).**

Develop- mental stage	Photo period	LD0 (Control)	LD40 (Malath- ion)	LD40 (Phos- phamidon)	Sources of variation	ANOVA				F, Critical		CD at 5 % level of significance
Stade de développement	Photo- période	DL0 (Témoin)	DL40	DL40	Sources de variation	ss	df	MS	F	5 %	1 %	DC au seuil de signification 5 %
L3	9D : 15L 18D : 6L	13.37 15.96	13.96 6.98	9.79 6.70	Photoperiod	27.49	1	27.49	1.802	4.75	9.33	6.95
					Insecticide	128.291	2	64.15	4.204*	3.89	6.93	
					Interaction	69.355	2	34.68	2.273	3.89	6.93	
					Error / Ecart	183.114	12	15.26				
E4	9D : 15L 18D : 6L	11.00 11.4	7.79 6.48	8.40 14.49	Photoperiod	13.382	1	13.38	2.04			4.56
					Insecticide	70.376	2	35.19	5.37*			
					Interaction	44.99	2	22.49	3.43			
					Error / Ecart	78.671	12	6.56				
L4	9D : 15L 18D : 6L	13.997 7.937	10.99 9.27	10.25 5.98	Photoperiod	72.722	1	72.722	105.742**			1.475
					Insecticide	25.79	2	12.896	18.752**			
					Interaction	14.25	2	7.127	10.363**			
					Error / Ecart	8.253	12	0.688				
E5	9D : 15L 18D : 6L	8.95 5.50	5.61 8.88	12.18 7.08	Photoperiod	13.978	1	13.98	2.605			4.122
					Insecticide	22.907	2	11.45	2.134			
					Interaction	58.875	2	29.44	5.485*			
					Error / Ecart	64.398	12	5.37				
L5 (Male)	9D : 15L 18D : 6L	25.197 19.577	14.61 11.28	20.257 19.56	Photoperiod	46.529	1	46.53	2.653			7.45
					Insecticide	287.55	2	143.78	8.197**			
					Interaction	18.209	2	9.104	0.519			
					Error / Ecart	210.488	12	17.541				
L5 (Female)	9D : 15L 18D : 6L	10.76 9.68	10.51 8.29	8.11 8.55	Photoperiod	4.099	1	4.099	2.924			2.107
					Insecticide	10.797	2	5.398	3.851			
					Interaction	5.344	2	2.672	1.906			
					Error / Ecart	16.822	12	1.402				

Tableau 1 (Continued). / *Tableau 1 (Suite).*

Develop- mental stage	Photo period	LD0 (Control)	LD40 (Malath- ion)	LD40 (Phos- phamidon)	Sources of variation	A N O V A				F. Critical		CD at 5 % level of significance
<i>Stade de développement</i>	<i>Photo- période</i>	<i>DL0 (Témoin)</i>	<i>DL40</i>	<i>DL40</i>	<i>Sources de variation</i>	<i>ss</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>5 %</i>	<i>1 %</i>	<i>DC au seuil de signification 5 %</i>
EP (Male)	9D : 15L 18D : 6L	142.04 32.13	22.12 23.72	49.03 23.78	Photoperiod	8919.58	1	8919.582	7.608*			60.92
					Insecticide	13734.64	2	6867.32	5.857*			
					Interaction	10162.01	2	5081.007	4.334*			
					Error / <i>Ecart</i>	14069.64	12	1172.47				
EP (Female)	9D : 15L 18D : 6L	33.88 27.51	19.96 18.72	50.31 26.42	Photoperiod	2.088	1	2.088	3.769			1.324
					Insecticide	433.57	2	216.785	391.486**			
					Interaction	200.8131	2	100.407	181.321**			
					Error / <i>Ecart</i>	6.645	12	0.554				
LP (Male)	9D : 15L 18D : 6L	38.04 73.69	29.61 52.89	48.07 32.66	Photoperiod	946.9952	1	946.995	18.637**			12.68
					Insecticide	908.8791	2	454.439	8.943**			
					Interaction	2128.141	2	1064.071	20.940**			
					Error / <i>Ecart</i>	609.773	12	50.814				
LP (Female)	9D : 15L 18D : 6L	36.77 39.60	27.49 27.86	25.73 37.91	Photoperiod	118.375	1	118.375	10.782**			5.896
					Insecticide	336.338	2	168.169	15.318**			
					Interaction	116.429	2	58.215	5.303*			
					Error / <i>Ecart</i>	131.744	12					
Adult (M)	9D : 15L 18D : 6L	95.05 63.85	53 209.59	57.44 11.59	Photoperiod	3140.55	1	3140.55	15.648**			25.21
					Insecticide	28236.12	2	14118.06	70.343**			
					Interaction	38118.75	2	19059.38	94.963**			
					Error / <i>Ecart</i>	2408.448	12	200.704				
Adult (F)	9D : 15L 18D : 6L	36.84 39.58	36.29 35.25	33.64 27.28	Photoperiod	10.8578	1	10.858	0.250			11.72
					Insecticide	188.444	2	94.222	2.171			
					Interaction	62.791	2	31.396	0.723			
					Error / <i>Ecart</i>	520.829	12	43.402				

*Significant at 5 % level of significance / *Significatif au seuil de signification de 5 %*. **Significant at 1 % level of significance / *Significatif au seuil de signification de 1 %*.

SS: Sum of squares / *Sommes des carrés*. df: Degree of freedom / *Degré de liberté*. MS: Mean sum of squares / *Somme moyenne des carrés*.

F: Variance ratio / *Ratio de variance*.

Impact of phosphamidon and photoperiod :

As shown in Fig. 1a - 1c the total lipid in 18D: 6L regime after application of LD₄₀ dose of phosphamidon, significantly declined in late third and late fourth instar followed by a non - significant variation in fifth instar. While compared with the phosphamidon induced change in total lipid in 9D : 15L regime, lipid depletion occurred earlier in 18D: 6L regime. This again was possibly due to photochemical alteration of phosphamidon as discussed in case of malathion. (Table I).

Later in the development till adult, total lipid decreased in treated insect except in early pupa, late pupa (female), where the variation with the untreated control in 18D: 6L regime was not significant. This might be because of high lipid accumulation in pupa in short day condition since with high body lipid relatively smaller amount of hydrophobic chemical reach target organ and hence reduce toxicity (Geyer *et al.*, 1994).

CONCLUSION

Our studies show that susceptibility of *Antheraea assama* to insecticide varies depending on the light condition in which it is reared and indicates a possibility of interaction of photoperiod with the insect biochemical mechanism while responding to toxic action of insecticide. Extensive studies on this line may be useful for practical pest management purposes and also protect silk industry from insecticidal pollution.

REFERENCES

- BARUA A., BHATTACHARYA P. R., BARUA A. K. S., BORDOLOI, D. N. (1992). Oil pollutants and their effect on muga sericulture I : Nutritional quality of muga silk worm food plants (*M. bombycina*) J. Assam Sci. Soc., 34 (4), 59 - 66.
- BECK S. D. (1980) Insect photoperiodism. Academic Press, New York.
- BEGUM R., GOHAIN R. (1996). Detoxication of P - P' DDT by the hemocytes of the fifth instar *Philosamia ricini* Boisdu., J. Environ. Biol., 17 (2), 149 - 155.
- BLUM M. S. (1985). Fundamentals of insect physiology. Interscience Publication, New York.
- BORA D. (1998) Effect of environmental stress with special reference to photoperiod and insecticide on muga worms, *A. assama*. W. W. Ph. D. Thesis, Dibrugarh University, Assam.
- BORA D., HANDIQUE R. (1994) Effect of photoperiod on food consumption, food utilization, growth and development of *Antheraea assama* ww. larvae. Proc. Acad. Environ. Biol., 3 (1), 69 - 76.
- BORA D., HANDIQUE R., (1996) Insecticide induced biochemical changes in *Antheraea assama* W. W., Proc. Acad. Environ. Biol., 5 (2), 221 - 226.
- CHAPMAN R. F., CHAPMAN and HALL (1978). The insect structure and function.
- CHINYA P. K., RAY D. (1976) Lipid and water contents during metamorphosis in silkworm, *Bombyx mori* L. (Nistari). Indian J. Seric., XV, 31 - 31.
- CHUKWUDEBE A., MARCH R. B., OTHMAN M., FUKUTU T. R. (1989) Formation of trialkyl phosphorothioate esters from organophosphorus insecticides after exposure to either ultraviolet light or sunlight. J. Agric. Food Chem., 37 (2), 539 - 545.
- DOWNER R. G. H. (1978) Functional role of lipids in insects in 'Biochemistry of insects' (Ed. by Rockstein, M. S.) Academic Press, New York.
- GEORGE A. K., MURALEEDHARAN D. (1990) Role of corpus allatum on the modulation of the feeding rhythm in the semilooper caterpillar *Achaea janata* Linn., Chronobiologia International, 7, 419.
- GEYER H. J., SCHEUNERT I., BRUGGEMAN R., MATTHIES M., STEINBERG C. E. W., ZITHO V., KETTRUP A., GARRISON W., (1994) The relevance of aquatic organism's lipid content to the toxicity of lipophilic chemicals : Toxicity of Lindane on different fish species. Ecotoxicology and Environ. Safety, 28 (1), 53 - 70.

- GUPTA S. C., KAPOOR V. K. (1995) Fundamentals of Applied Statistics. 5. 30. SULTAN CHAND and SONS.
- HAZARIKA L. K., KATAKY A., KATKY J. C. S., HAZARIKA J. (1995) Fats and fatty acids composition of muga silkworm and its host plants. J. Assam. Sci. Soc., 37 (1), 45 - 50.
- JAYARAMAN J. (1985) Laboratory manual in biochemistry. Wiley Eastern. Ltd. India.
- LOHAR M. K., WRIGHT D. J. (1992) Sublethal effects of malathion on the oxygen consumption and heat beat of female, *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera : Tenebrionidae). Pakistan J. of Zool., 24 (2), 115 - 117.
- LOHAR M. K., WRIGHT D. J. (1993) Changes in the lipid content in haemolymph, fat body and oocytes of malathion treated *Tenebrio molitor* L. adult females. Pakistan J. of Zool., 25 (1), 57 - 60.
- PRASAD B. C. (1993) Studies on some important aspects of eri culture in north eastern region with special emphasis on its economics. Ph. D. Thesis.
- PRASAD S. V., FERNANDO W. G. J. P., SUMIDA M., LAW J. H., WELLS, M. A. (1986). Lipoprotein biosynthesis in the larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Biol. Chem., 261, 17174 - 76.
- PRASAD S. V., TSUCHIDA K., COLE K. D., WELLS M. A. (1987) Lipophorin biosynthesis during the life cycle of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. U. C. L. A. Symp - Mol. Cell. Biol., 49, 267 - 273.
- RAO K. D. P., AGARWAL H. G. (1970) Lipids of *Trogoderma granarium* Everts - II. Lipids and glycogen content during development. Indian. J. Ent. 32 (4), 318 - 323.
- ROCKSTEIN M. (1978) Biochemistry of insects. Academic Press. New York.
- SAXENA P. N. (1990) Organophosphate intoxication in insect body: Penetration, kinetic and target site interaction, in 'Environmental impact on biosystems' (Ed. by Dalela, R. C.), 47 - 67.
- SHAPIRO J. P., LAW J. H., WELLS M. A. (1988) Lipid transport in insects. Ann. Rev. Entomol. 33 : 297 - 318.
- TAZIMA Y. (1978). The silkworm: an important laboratory tool. Kodansha, Tokyo.
- TURUNEN S., CHIPPENDALE G. M. (1981) Relationship of lipoprotein present in the larval haemolymph of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella* to the feeding and diapause. Comp. Biochem. Physiol., B, 70, 759 - 765.
- UNNI B. G., KATOKY A. K., KHANIKAR D., BHATTACHARJE P. R., PHATAK M. G., PALLAI K., PILLAI R., CHOUDHURY A., SAIKIA P. C., GHOSH A. C. (1996) Lipid and fatty acid composition of muga silkworm, *Antheraea assama*, host plants in relation to silkworm growth. J. Lipid Med. Cell Sig., 13, 295 - 300.
- WIGGLESWORTH V. B. (1972) The principles of insect physiology. Methuen & Co. London.
- WILKINSON C. F., (1976) Insecticide biochemistry and physiology. Plenum Press. New York.

TENEUR EN LIPIDES DU VER A SOIE MUGA, *ANTHERAEA ASSAMA* WESTWOOD : IMPACT DE LA PHOTOPERIODE ET DES INSECTICIDES

D. S. BORA & R. HANDIQUE

Department of Life Sciences, Dibrugarh University, Dibrugarh - 786 004, Assam, Inde.

Antheraea assama lorsqu'il est élevé dans des conditions de courte période diurne (18O : 6L), voit la teneur totale en lipides des insectes augmenter pendant les premiers stades, puis une plus grande teneur en lipides se manifeste chez la chrysalide. Quand un jeune stade larvaire est exposé aux insecticides OP (malathion et phosphamidon), une réponse différée a été observée. Elle s'exprime par le déclin du niveau des lipides totaux pour le régime 15h de jour, tandis que pour le régime 6h de jour, l'effet toxique s'exprime immédiatement.

INTRODUCTION

La littérature révèle que la teneur nutritionnelle des plantes détermine de façon importante la croissance, le développement et le rendement en soie des insectes séricigènes (Prasad, 1993). A ce jour, chez les vers à soie muga, des résultats probants n'ont pas encore été obtenus avec l'alimentation artificielle, c'est pourquoi les besoins nutritionnels de ces vers ne sont pas encore totalement connus. En outre, les adultes *Antheraea assama* ne consomment pas de nourriture et l'efficacité de leur reproduction dépend du niveau nutritionnel de la larve en développement. Le ver muga a été signalé comme étant sensible à l'action des insecticides (Bora et Handique, 1996) et en est victime, étant une espèce non - cible. En Assam, le brûlage constant de gaz à basse pression produits par les industries pétrolières change la photopériode et la thermopériode des régions avoisinantes et les rapports abondent sur l'effet de la pollution sur la population des vers muga dont les stades larvaires sont élevés en extérieur sur des plantes (Barua et coll., 1992). La toxicité des insecticides sur l'environnement est controversée parce que les insecticides pourraient subir une biotransformation par les microbes, les plantes ou le genre animal ou bien encore, ils pourraient subir une transformation photochimique grâce à la photopériode et à la thermopériode naturelles de la terre. Chukwudebe et coll., (1989) rapportent que plusieurs insecticides organophosphorés exposés à la lumière du soleil ou aux UV sont convertis en composés qui ont des effets toxiques différés. Sous des conditions contrôlées de laboratoire où la photopériode artificielle est maintenue à l'aide d'une ampoule, la part d'UV de l'ensoleillement naturel vient à manquer. La raison pour laquelle une telle lumière aura une action pesticide différente, n'est pas encore bien comprise. Ainsi, l'étude actuelle a été entreprise en vue d'évaluer les changements biochimiques (en lipides) et leur relation avec la photodécomposition de doses sublétales d'insecticides organophosphorés, le malathion et le phosphamidon, lors de conditions d'élevage en intérieur.

MATERIELS ET METHODES

Les pontes saines d'*Antheraea assama* ont été recueillies dans une ferme séricicole gouvernementale à Tingrai, Assam et l'élevage fut dirigé en intérieur selon Bora et Handique (1994).

Deux régimes photopériodiques ont été maintenus avec 95,0 - 97,0 lx d'intensité lumineuse pour le régime 9O : 15 L (témoin) et 21,5 - 23,0 lx pour le régime 18O : 6L. La température et l'humidité relative pendant la photophase était de 22 - 32° C et de 85 - 56 % respectivement et durant la scotophase, elle était de 32 - 26° C et de 56 - 81 % respectivement. Une dose sub létale (LD₄₀) de malathion (141 ppm) et de phosphamidon (123 ppm) (Bora, 1998) a été appliquée au début du troisième stade larvaire par le moyen de feuilles de *Machilus bombycina* traitées. Des insectes à différentes étapes de développement ont été sacrifiés à la fin du troisième stade larvaire, au début et à la fin du quatrième et du cinquième stade, ainsi qu'au stade chrysalide et au stade adulte.

Collecte du matériel :

En ce qui concerne la collecte des insectes, le début d'un stade signifie le jour juste après une mue et la fin d'un stade signifie le jour juste avant la prochaine mue dans le cas des stades larvaires. En ce qui concerne la chrysalide, le début d'un stade signifie le premier jour du stade de la chrysalide et la fin signifie le dix - huitième jour qui se trouve être le dernier jour de la durée chrysalidaire chez les insectes témoins. Pour chaque échantillon, 15 larves ont été collectées au hasard et sacrifiées en trois groupes, à des fins d'analyse.

Extraction lipidique :

Le corps frais de l'insecte a été tué en utilisant du chloroforme, puis lavé avec de l'eau distillée et séché sur du papier filtre. Le sacrifice de tous les insectes fut réalisé entre 8h et 9h et ils ont été homogénéisés dans un Potter Elvehjen avec un piston en téflon dans de l'eau distillée. Les lipides totaux ont été extraits à l'aide d'un mélange de chloroforme : méthanol (2 : 1) et évalué grâce à la méthode de Bligh et Dyar (Jayaraman, 1985). Comme le poids frais a été pris immédiatement avant et après la mue, l'intestin était vide de toute substance alimentaire, c'est la raison pour laquelle le contenu de l'intestin n'a pas été compris dans les dosages de lipides totaux. Les données ont été analysées statistiquement par analyse de variance à deux facteurs contrôlés et les différences critiques ont été enregistrées, ainsi qu'il est indiqué dans le Tableau I.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont résumés de la Fig. 1a à 1e et dans le Tableau I.

Les variations en lipides totaux pendant la métamorphose chez *Antharaea assama* indiquent, pour les larves élevées en photopériode 9O : 15L un taux de lipides accumulé qui croît avec l'âge jusqu'à la fin du cinquième stade. Un tel accroissement en fonction de l'âge a aussi été signalé chez d'autres insectes (Rao et Agarwal, 1970).

Les huiles essentielles et les acides gras de *Machilus bombycina* sont connus pour influencer la sélection de la nourriture chez les vers à soie muga (Hazarika et coll., 1995). La teneur en lipides et en acides gras des plantes 'Som' a été signalée comme étant moindre chez les jeunes feuilles (Unni et coll., 1996) et en conséquence le passage aux feuilles matures chez les larves plus âgées semble être en relation avec la teneur accrue en lipides à l'intérieur de leur corps. Les lipides qui sont nécessaires pour la croissance fonctionnelle et structurelle (Blum, 1985) et conservés en tant que source énergétique de réserve sont également obtenus par interconversion des protéines et des hydrates de carbone. La période de mue est un stade sans absorption de nourriture et c'est pourquoi, peu après la mue, les lipides totaux diminuent (Prasad et coll., 1986, 1987 ; Shapiro et coll., 1988 ; Rockstein, 1978).

Durant la période chrysalide, la teneur en lipides totaux est plus importante que celle du stade larvaire mais il y a une chute du taux de lipides du premier au dernier stade chrysalidaire. Des études en laboratoire sur la teneur en protéines des vers à soie muga (Bora, 1998) ont établi que les protéines et les acides aminés sont nécessaires aux lépidoptères pour la formation des tissus imaginaires (Chapman, 1978) et c'est pourquoi une partie des lipides pourrait être convertie afin de maintenir le

taux de ces composés. La littérature révèle également un quotient respiratoire peu élevé chez la chrysalide des lépidoptères (Wigglesworth, 1972) et également une courbe en U pour le métabolisme respiratoire de *Bombyx mori* (Tazima, 1978), ce qui pourrait indiquer une possibilité de l'utilisation des lipides comme un substrat d'énergie pendant la période de non consommation de nourriture de la chrysalide d'*Antheraea assama*.

Les lipides totaux présentent un dimorphisme sexuel et les mâles contiennent une teneur en lipides plus importante que les femelles. Ceci a également été observé chez *Bombyx mori* (Chinya et Ray, 1976). Les adultes mâles chez *Antheraea assama*, sont des insectes volants actifs qui doivent suivre la phéromone sexuelle libérée par les femelles fragiles et léthargiques. Dans ce but, ils demandent une énergie supplémentaire et la teneur en lipides totaux des mâles adultes pourrait être une étape préparatoire à cette intention, puisque les lipides sont un meilleur substrat pour le vol des insectes (Downer, 1978).

Impact de la photopériode sur la teneur en lipides :

Lorsque l'on compare la teneur en lipides des larves au régime 9O : 15L, à celle des larves au régime 18O : 6L, qui en sont à leur troisième âge, la teneur en lipides augmente alors qu'elle baisse à partir du quatrième âge jusqu'au filage, comme il est indiqué dans les Fig. 1a à 1c. Ceci pourrait être le résultat d'une accumulation accrue de lipides pendant les premiers stades larvaires pour les larves en régime de courte période diurne. Chez les insectes, la rythmicité circadienne manifestée par le *corpus cardiacum* et les cellules neurosécrétrices du cerveau peuvent influencer les changements journaliers du rythme de prise de nourriture et des biocomposants, puisque le titre de certaines hormones varie lui aussi rythmiquement dans la journée (Beck, 1980 ; George et Muraleedharan, 1990). Cependant aucune conclusion ne peut être tirée puisque le rythme circadien des cellules neurosécrétrices chez *A. assama* n'a pas encore été étudié.

Pendant le stade chrysalidaire, les larves en régime 9O : 15L expriment une diminution des lipides totaux entre les premiers et les derniers stades larvaires, alors que les larves en régime 18O : 6L expriment une augmentation multipliée par 2,29 pour les mâles et par 1,44 pour les femelles. Une telle accumulation de lipides pendant le stade chrysalidaire pour des larves en régime de courte période diurne, peut indiquer une caractéristique diapausante puisque les lipides sont nécessaires pendant le stade sans absorption de nourriture de la diapause (Turunen et Chippendale, 1981). Bien que dans l'étude actuelle, la diapause ne peut être provoquée chez *A. assama*, nos résultats pourraient indiquer une potentialité pour *A. assama* de subir la diapause dans le cas d'un régime de courte période diurne (Fig. 1a).

Influence du malathion sur la teneur en lipides :

Pour le régime 9O : 15L la teneur en lipides totaux ne manifesta pas de changements significatifs lorsque les larves furent nourries avec des feuilles, immédiatement après qu'elles aient été traitées au malathion, dosé à DL₄₀. Les insecticides ingérés oralement peuvent être lents à déclencher une réaction en raison de leur absorption plus lente. Il a aussi été suggéré que les anticholinestérases pouvaient interagir afin de provoquer des modifications dans l'absorption gastrique de divers matériaux, en raison de leurs effets stimulants sur le système parasymphatique et par voie de conséquence sur la motilité péristaltique (Wilkinson, 1976). L'effet différé a été observé à la fin des quatrième et cinquième stades chez les mâles, période pendant laquelle les lipides totaux avaient diminué (Fig. 1a - 1c).

Les insecticides appliqués à des organismes cibles dans l'environnement peuvent pénétrer dans le corps des insectes par l'intermédiaire du tégument ou directement par l'orifice respiratoire ou encore par ingestion orale. Lors de la pénétration et du processus de distribution, certains des insecticides peuvent être absorbés par les insectes à travers les hémocytes, puis stockés dans les hémocytes ou les tissus corporels, comme le tissu adipeux. Ils deviennent indisponibles biologiquement (Saxena, 1990 ; Begum et Gohain, 1996) et ainsi leur effet en est différé.

Le malathion est également converti enzymatiquement dans le corps de l'insecte, en une substance plus toxique, le malaaxon.

La toxicité du composé OP augmente la consommation d'O₂ et par voie de conséquence, une augmentation du taux métabolique est observée (Lohar et Wright, 1992). Ceci pourrait conduire à un épuisement des lipides afin de faire face à la demande d'énergie supplémentaire. De même, après la métamorphose de la larve à la chrysalide, pour les premiers et derniers stades chrysalidaires ainsi que pour les adultes, le malathion cause un épuisement des lipides totaux pour le régime 9O : 15L (Fig. 1d - 1e). Une telle diminution peut être considérée comme un signe de toxicité et ceci est en accord avec les tests de toxicité menés par d'autres auteurs. Lohar et Wright (1993) établirent que le malathion réduisait les lipides totaux dans l'hémolymphe, le corps adipeux et les oocytes.

Impact du malathion et de la photopériode :

Pour le régime 18N : 6J, alors que le malathion était appliqué à la dose DL₄₀ et que les larves qui survécurent furent élevées jusqu'à l'âge adulte, les lipides totaux diminuèrent de façon significative pendant le troisième stade, puis une variation insignifiante suivit jusqu'au début du cinquième stade. Le taux diminua ensuite pendant la fin du cinquième stade pour les mâles lorsqu'on les compare aux témoins non traités (Fig. 1a - 1c).

La diminution passagère qui se manifesta pendant la fin du troisième stade est le résultat de la réponse à une demande supplémentaire en énergie. Une étude comparative indique que la réponse au malathion a été différée pour 9O : 15L, alors qu'elle s'exprima immédiatement après que le traitement fut arrêté (à la fin du troisième stade) pour le régime 18O : 6L. Ceci confirme vraisemblablement l'étude de Chukwudebe et coll. (1989) qui montrèrent que la lumière du soleil convertit le malathion en un composé ayant une action toxique différée.

Chez les adultes mâles *A. assama*, il y eut une nette augmentation des lipides corporels totaux après l'éclosion, alors que chez les femelles, la variation était insignifiante en comparaison avec les témoins non traités en régime 6h Lumière. Ceci pourrait indiquer une dépense moindre en énergie chez les mâles, bien qu'une augmentation de l'accumulation pris place, mais ceci fut également observé pour le régime 9N : 15J.

Influence du phosphamidon sur la teneur en lipides :

Lorsqu'on appliqua du phosphamidon à la dose DL₄₀ au régime 9O : 15L, une baisse significative de la photopériode fut observée pendant la fin du cinquième stade chez les femelles en comparaison avec les témoins non traités, ceci étant illustré en Fig. 1e. Une telle diminution différée peut indiquer un mode d'action du phosphamidon similaire à celui du malathion décrit plus haut, sinon qu'avec le phosphamidon, la durée d'expression manifeste fut davantage différée qu'avec le traitement au malathion. De manière similaire, durant les derniers stades de développement, il y eut un épuisement des lipides totaux en comparaison avec les témoins non traités. Ce mode d'action du phosphamidon ressemble à celui du malathion.

Impact du phosphamidon et de la photopériode :

Ainsi qu'il est illustré de la Fig. 1a à 1c, les lipides totaux du régime 18O : 6L, après application d'une dose LD₄₀ de phosphamidon, diminuèrent de manière significative pendant la fin du troisième et du quatrième stade, suivi par une variation non significative pendant le cinquième stade. Lorsque l'on compare les changements induits par le phosphamidon dans les lipides totaux, l'épuisement des lipides se manifesta plus tôt pour le régime 18O : 6L, que pour le régime 9O : 15L. Ceci est encore probablement dû à l'altération photochimique du phosphamidon, comme il en a été discuté pour le malathion (Tableau 1).

Plus tard et jusqu'à l'âge adulte, les lipides totaux diminuèrent chez les insectes traités, à l'exception des premiers et derniers stades chrysalidaires, chez les femelles, pour qui les variations avec les témoins non traités en régime 18O : 6L n'étaient pas significatives. Ceci est peut-être dû à

une accumulation importante de lipides chez la chrysalide en régime de courte période diurne, puisqu'avec une teneur en lipides élevée, une quantité relativement plus petite de matériel chimique hydrophobique atteint les organes cibles et par voie de conséquence, réduit la toxicité (Geyer et coll., 1994).

CONCLUSION

Notre étude montre que la sensibilité d'*Antheraea assama* aux insecticides varie selon les conditions de lumière dans lesquelles l'espèce est élevée. Elle indique également une possibilité d'interaction de la photopériode avec le mécanisme biochimique de l'insecte tandis que celui-ci répond à l'action toxique des insecticides. Des études extensives dans ce domaine seraient utiles à des fins pratiques de contrôle des parasites, mais également en vue de protéger l'industrie de la soie de la pollution insecticide.

NEW RECORD OF A HOMOPTERAN PEST ON MULBERRY (*MORUS ALBA*)

U. K. BANDYOPADHYAY, S. K. RAINA, N. CHAKRABORTY, M. V. SANTHAKUMAR,
S. K. SEN & B. SARATCHANDRA.

Central Sericultural Research & Training Institute, Entomology Division, Berhampore - 742101,
West Bengal, India.

Keywords : Whitefly, mulberry, new record.

Mulberry, *Morus alba* L. is the sole food plant for silkworm, *Bombyx mori* L. India is the second largest silk growing country, producing about 11 487 tons of raw silk, covering 0.342 million ha under mulberry cultivation, out of which 0.05 million ha is under cultivation in West Bengal. Like most of the other economic plantations and field crops, mulberry is prone to the attack of a varied pest complex belonging to a large number of insect orders. Though the frequent leaf plucking and pruning of the shoot restrict the attack of pests, many of them still find enough time and place on mulberry for feeding and breeding. So far only two major pests, viz., mealy bug and thrips used to cause concern in the mulberry gardens of CSR & TI, Berhampore. But since 1994, one more hazardous pest, i.e. whitefly, started its entry and became a major problem today. It reduces the nutritional values of mulberry leaf to a greater extent. The present species has been identified as *Dialeuropora decempuncta* (Quaintance & Baker) (Homoptera: Aleyrodidae). The genus *Dialeuropora* is widespread and reported in Ethiopian and Oriental regions (Quaintance & Baker, 1913; Cohic, 1966; Qureshi & Qayyum, 1969; Gameel, 1970; Byrne, 1991). This report is first of its kind in India as well as in mulberry.

On mulberry, whitefly starts appearing in higher numbers from July onwards and reaches its peak during September (average 55 - 60 adults / leaf). The minimum no. of whitefly population is observed during March - June and December - February. Correlation studies have shown that high humidity (70 - 85%), moderate temperature (24 - 30° C) and moderate rainfall (178 - 389 mm) influence the maximum incidence of the pest.

During an extensive survey conducted in farmer's fields for its incidence on mulberry, it was also found to infest the adjoining agricultural crops like Tomato, French bean, Lady's finger (*Abelmoschus esculentus*), Brinjal (*Solanum melongena*), Chillies, fruit crops like Litchi etc.

Adults of *D. decempuncta* have two pairs of wings covered with white waxy powder, distinct red compound eyes, wings are equal in size, thorax well developed, abdomen ovate and thickest, moderately long legs (Fig 1.). The mean length of adults measures 0.68 mm and wings expand 1.88 mm. Like other whitefly species (Byrne, 1991), they generally emerge in the mulberry field from their pupal cases in the morning between 6 and 9 a.m. as in *Bemisia tabaci* on cotton (Butler *et al.*, 1983). This is evident from the present findings that the maximum adult population of white fly is observed during early morning on mulberry plants.

Eggs are elliptical in shape, straw coloured, smooth and shiny, average length and breadth is 0.13 mm and 0.09 mm respectively. Eggs are attached to the ventral surface of leaf by a short pedicel. Nymphs are oval in shape, reddish yellow; the body measures 0.92 mm and 0.06 mm in length and breadth respectively (Fig 2.). The adults generally select tender mulberry leaf due to higher amount

of juicy material. Vertical distribution studies showed that adults are found on the topmost two leaves, whereas eggs and nymphs are found on 2 - 4 th and 7 - 14 th position of leaves respectively. The 1st nymphal instar is active for a short time and moves to a suitable place, where it settles down. At the late nymphal stage it moults, flattens and spreads on the leaf, becomes sedentary and appears like a scale insect. These nymphal stages are covered with cuticular waxy coating.

The honey dew secreted by nymphs serve as a medium for growth of bluish mycelia of sooty mould fungi, *Chaetothyrium sp.* and *Curvularia affinis* Boedijn causing sooty mould disease of mulberry. These fungi form a black velvety coating on the upper surface (dorsal surface) of mulberry leaves. This severely causes the depletion of chlorophyll content which results in reduction of photosynthesis, yellowing of leaves, premature leaf fall etc. (Rao *et al.*, 1992).

This homopteran insect damages mulberry leaf by extracting large quantities of phloem sap which results in 23.77% mulberry leaf yield loss. Adults and nymphs suck the cell sap from the lower surface of the leaves by inserting their sharp stylets in the leaf tissue and this acts as a potential vector of leaf curl virus causing leaf curl disease (Fig 3.).



Fig 1. Adult white flies on mulberry leaf.

Fig 1. *Aleurodes* adultes sur une feuille de mûrier.



Fig 2. Nymphs of white fly.

Fig 2. *Nymphes d'aleurodes.*



Fig 3. Top view of mulberry plants with leaf curl symptoms.

Fig 3. Vue sommitale de plants de mûrier atteints de symptômes d'enroulement foliaire.

Keeping in view the depletion of nutritive values and leaf yield loss in mulberry, the need of the hour is to develop an effective integrated management package to combat whitefly menace in order to ensure the quality of leaf production. To strengthen this cause further studies have to be conducted on the population dynamics of whitefly, chemical control by using ecofriendly plant borne pesticides and mechanical control by using sticky traps.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Dr. B. N. David, the Director, Jai Research Foundation, Vapi, Gujarat for identifying the pest and Mr. Debasish Roy, Artist and Mrs. Indira Roy for technical assistance.

REFERENCES

- BUTLER G. D. Jr., HENNEBERRY T. J. and CLAYTON T. (1983) *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae): development, oviposition and longevity in relation to temperature. Ann. Entomol. Soc. Amc. 76, 310-313, 1983.
- BYRNE D. N. (1991) Whitefly Biology. Ann. Rev. Entomol, 36, 431 - 457.
- COHIC F. (1966) Contribution à l'étude des aleurodes africains. Can. Off. Rech. Sci. Tech. Outre Mer (Biologie), 2, 13 - 72.
- GAMEEL O. I. (1970) New *Aleyrodidae*, *Dialeuropora ndiria* (Hemiptera: Homoptera). Revue. Zool. ot. afr, 84, 169 - 174.
- QUAINTANCE A. L. & BAKER A. C. (1913) Classification of the *Aleyrodidae*. Part. I. Tech. Ser. Bur. Ent. U. S. 27, 1 - 93.
- QURESHI J. I. & QAYYUM H. A. (1969) *Dialeuropora dothioensis* Dumbleton (Homoptera: Aleyrodidae) a new record from West Pakistan. Pakistan J. Zool. 2, 114 - 115.
- RAO A. A., CHAUHAN S. S., CHAKRABORTY S. & RAO G. S. (1992). A new report on the occurrences of *Chaetothyrium* and *Curvularia* fungi on Mulberry. Indian J. seric. 31 (1). 71.

UN NOUVEAU PARASITE HOMOPTERE DU MURIER (*MORUS ALBA*)

U. K. BANDYOPADHYAY, S. K. RAINA, N. CHAKRABORTY, M. V. SANTHAKUMAR,
S. K. SEN & B. SARATCHANDRA

Central Sericultural Research & Training Institute, Entomology Division, Berhampore - 742101,
West Bengal, Inde.

Le mûrier *Morus alba* L. est la seule nourriture du ver à soie *Bombyx mori* L. L'Inde est le deuxième plus grand pays producteur de soie, avec 11 487 tonnes de soie brute produite par an. La superficie couverte par la culture des mûriers atteint 0,342 million d'ha, dont 0,05 million sont cultivés au Bengale ouest. Comme la plupart des cultures en plein champ et d'autres plantations à visée économique, le mûrier est sujet aux attaques d'un ensemble de parasites qui appartiennent à un nombre important de familles d'insectes. Bien que la cueillette fréquente des feuilles et la taille des jeunes pousses réduisent l'attaque des parasites, beaucoup d'entre eux trouvent malgré tout le temps et l'espace pour se nourrir et se reproduire sur les mûriers. Jusqu'à ce jour, seulement deux parasites principaux, à savoir la cochenille et le thrips ont causé des problèmes dans les plantations de mûriers du C. S. R. & T. I., Berhampore. Cependant, depuis 1994, un parasite plus dangereux, l'aleurode a fait son entrée et est devenu un problème majeur aujourd'hui. Il réduit les valeurs nutritionnelles de la feuille de mûrier à un degré plus important. L'espèce actuelle a été identifiée comme *Dialeuropora decempuncta* Quaintance & Baker (Homoptère: *Aleyrodidae*). Le genre *Dialeuropora* est très répandu et sa présence est signalée en Ethiopie et dans les régions orientales (Quaintance & Baker, 1913 ; Cohic, 1966 ; Qureshi & Qayyum, 1969 ; Gameel, 1970 ; Byrne, 1991). Ce rapport est sans précédent en Inde, ainsi qu'en ce qui concerne les études sur le mûrier.

Sur le mûrier, l'aleurode commence à apparaître en grand nombre à partir de juillet et atteint un maximum en septembre (avec une moyenne de 55 à 60 adultes / feuille). Le nombre minimum de la population d'aleurodes est observé entre mars et juin et entre décembre et février. Des études de corrélation ont montré qu'une humidité importante (70 - 85 %), une température modérée (24 - 30° C) et des précipitations moyennes (178 - 389 mm) influent sur l'incidence maximum du parasite.

Lors d'une étude approfondie menée en plein champ, afin d'établir l'incidence de ce parasite sur le mûrier, il a également été remarqué qu'il infestait les cultures agricoles adjacentes telles que la tomate, le haricot vert, le gombo (*Abelmoschus esculentus*), l'aubergine (*Solanum mongena*), le piment, les cultures fruitières telles que le litchi etc...

Les adultes de *D. decempuncta* ont deux paires d'ailes de taille identique, recouvertes d'une poudre cireuse, des yeux rouges composés distincts, un thorax bien développé, un abdomen ovale et des pattes épaisses et modérément longues (Fig 1.). La longueur moyenne des adultes mesure 0,68 mm et les ailes ont une envergure de 1,88 mm. Comme d'autres espèces d'aleurodes (Byrne, 1991), ils émergent de leurs enveloppes pupales, dans les champs de mûrier, le matin généralement entre 6 h et 9 h comme le fait *Bemisia tabaci* sur le coton (Butler et coll., 1983). L'étude présente confirme que la population maximum d'aleurodes adultes est observée au petit matin sur les plants de mûrier.

Les oeufs sont de forme elliptique, de couleur paille, lisses et brillants dont la longueur et la largeur moyennes sont respectivement de 0,13 mm et 0,09 mm. Les oeufs sont attachés à la surface ventrale de la feuille par un pédicule court. Les nymphes sont de forme ovale, d'un jaune rougeâtre ; le corps

mesure 0,92 mm de longueur et 0,06 mm de largeur (Fig 2.). Les adultes sélectionnent généralement les feuilles tendres du mûrier en raison de leur quantité élevée en matériaux juteux. Des études de distribution verticale montrent qu'on trouve les adultes sur les feuilles les plus hautes, alors que les oeufs se trouvent entre les 2^{ème} et 4^{ème} feuilles et les nymphes entre les 7^{ème} et 14^{ème}. Le premier stade nymphal est actif pendant une courte période, puis il se déplace vers un endroit qui lui convient, où il se sédentarise. Pendant le dernier stade nymphal, il mue, s'applatit et s'étend sur la feuille, devient sédentaire et ressemble à une cochenille. Pendant les stades nymphaux, l'insecte est recouvert d'une pellicule cuticulaire cireuse.

La miellure sécrétée par les nymphes sert de milieu pour la croissance du mycélium bleuâtre du champignon *Chaetothyrium sp.* causant une moisissure noire et de *Curvularia affinis* Boedijn qui est responsable de la maladie de la moisissure noire du mûrier. Ces champignons forment un revêtement duveteux et noir sur la surface supérieure (surface dorsale) des feuilles de mûrier. Ceci aboutit à un épuisement sévère de la teneur en chlorophylle, qui lui-même aboutit à une diminution de la photosynthèse, au jaunissement des feuilles, à la chute prématurée des feuilles etc. (Rao et coll., 1992)

Cet insecte homoptère détériore la feuille de mûrier en extrayant des quantités importantes de sève élaborée, ce qui aboutit à une perte du rendement en feuilles de mûrier de 23,77 %. Les adultes et les nymphes sucent la sève à partir de la surface inférieure des feuilles en insérant leur stylets pointus dans le tissu foliaire et ceci agit comme un vecteur potentiel du virus de l'enroulement foliaire responsable de la maladie de l'enroulement foliaire (Fig 3.).

Si l'on considère l'épuisement des valeurs nutritives et la perte du rendement en feuilles du mûrier, le besoin actuel est de développer un ensemble de mesures efficaces intégrées en matière de lutte contre la menace des invasions d'aleurodes, afin d'assurer la qualité de la production des feuilles. Dans le but de renforcer cette lutte, des études élaborées doivent être menées sur la dynamique de la population des aleurodes, ainsi qu'une lutte chimique qui utiliserait des pesticides écologiques élaborés à partir de plantes et une lutte mécanique qui utiliserait des pièges collants.

SUSCEPTIBILITY OF THE LEAF-ROLLER PEST OF MULBERRY, *DIAPHANIA (MARGARONIA) PULVERULENTALIS* TO *NOSEMA BOMBYCIS* DUE TO SECONDARY CONTAMINATION

M. GEETHA BAI & T. RAMEGOWDA

Karnataka State Sericulture Research and development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore - 560 062, India

The leaf-roller pest of mulberry, Diaphania (Margaronia) pulverulentalis (Hampson) (Lepidoptera: Pyralidae) is found to be susceptible to Nosema bombycis Nageli (Microsporida: Nosematidae), the causative pathogen of pebrine disease in Bombyx mori L. (Lepidoptera: Bombycidae), due to secondary contamination in the laboratory. B. mori is susceptible to pebrine spores isolated from infected D. pulverulentalis caterpillars. The impact of susceptibility of the leaf-roller pest to pebrine disease on silk industry is discussed.

Keywords: Leaf-roller, *Diaphania pulverulentalis*, *Morus alba*, pebrine spores, *Nosema bombycis*, *Bombyx mori*.

INTRODUCTION

The leaf-roller pest, *Diaphania (Margaronia) pulverulentalis* (Hampson) (Lepidoptera: Pyralidae) was found devastating mulberry plantations for the first time in Karnataka, India, during September 1995 and it reoccurred during 1996 (Geetha Bai *et al.*, 1997) and in 1997. *Nosema bombycis* Nageli (Microsporida: Nosematidae), the causative pathogen of pebrine disease in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera, Bombycidae) has a wide host range (Steinhaus, 1949 ; Machay, 1957 ; Kashkarova, 1981 ; Srikanta, 1987 ; Jolly, 1986 ; Iwano and Ishihara, 1991). Iwano and Ishihara (1991) isolated *N. bombycis* from moths of lawn grass cutworm, *Spodoptera depravata* Butler. This pest is reported to be a natural reservoir of *N. bombycis* in Japan (Ishihara and Iwano, 1991). Some pests of mulberry are susceptible to silkworm pathogens. *Spilosoma obliqua* (Walker), (Lepidoptera: Aretiidae), *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Euproctis fraterna* (Lepidoptera: Lymantriidae) were found susceptible to *N. bombycis*, causing the dreaded pebrine disease in silkworms (Anonymous, 1984).

During the present investigations, susceptibility of *D. pulverulentalis* to *N. bombycis* spores isolated from *B. mori* and susceptibility of *B. mori* to *N. bombycis* spores isolated from *D. pulverulentalis* due to secondary contamination was tested in the laboratory and results are presented here.

MATERIALS AND METHODS

A clear suspension of *N. bombycis* used in this study was obtained from tissue homogenates of infected *B. mori* by triangulation method (Cole, 1970). Susceptibility of *D. pulverulentalis* was studied by feeding second and third instar caterpillars with mulberry leaves smeared with spore suspension of known spore count isolated from *B. mori*. One ml of spore suspension per 50 larvae was used to infect known number of second and third instar leaf-roller caterpillars in ten batches. Spore suspension was smeared on mulberry leaves and air-dried in shade. The test caterpillars were starved for 24 hours prior to the infective feed. After all the leaves smeared with pebrine spore suspension were consumed by the test caterpillars, fresh mulberry leaves free from pebrine spores was fed to silkworms till pupation. All the dead caterpillars, pupae and moths emerged were examined for pebrine spores and results recorded.

N. bombycis spores isolated from infected *D. pulverulentalis* by triangulation method was used to test its susceptibility to *B. mori*. Second instar silkworms of race N B₄D₂ were used for this test. Two ml of pebrine spore suspension of known concentration, i.e., 5.6×10^4 , 5.6×10^5 , 5.6×10^6 , and 5.6×10^7 spores / ml smeared on mulberry leaf surface was fed to silkworms, after the first moult. The infective feeding was followed by normal feeding and rearing was continued. Silkworms in infected control were fed with mulberry leaves smeared with 2 ml of pebrine spore suspension with 3.9×10^7 spores / ml, isolated from silkworms. In uninfected control, silkworms were fed with mulberry leaves smeared with water. There were 50 silkworms in each test batch and each treatment was replicated four times.

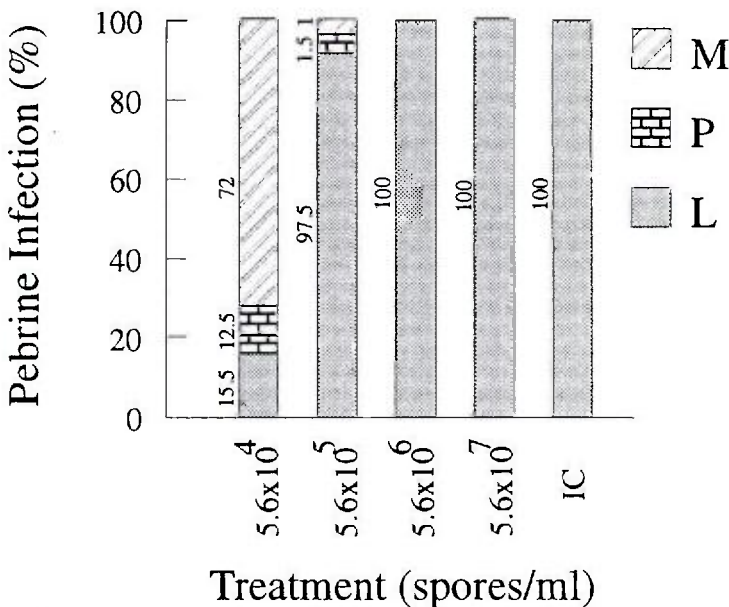
RESULTS AND DISCUSSION

(i) Susceptibility of *D. pulverulentalis*:

D. pulverulentalis, an important pest of mulberry in Karnataka was found to be susceptible to *N. bombycis* in the laboratory (Table I). When 188 second instar *B. mori* caterpillars in four batches were fed on mulberry leaves smeared with 1 ml of pebrine spore suspension with 3.9×10^7 spores / ml / 50 larvae, heavy larval and pupal mortality due to pebrine disease was recorded. Larval mortality ranged from 15.6 to 30.6 % (Average = 22.5 %). Pebrine infected *D. pulverulentalis* larvae have poor appetite. They shrink in size and unequals are seen due to differential development. Pupal mortality was heavier than larval mortality, pupal mortality being 43.8 to 58.3 % (Average = 50.83 %). Infected leaf-roller pupae are deep dark brown in colour and are soft, compared to healthy pupae. *D. pulverulentalis* died in larval or pupal stage. When 146 third instar leaf-roller caterpillars in three batches were given infective feeding using 1 ml of spore suspension with 3.9×10^7 spores / ml / 50 larvae, all died in larval or pupal stage in the first two batches, while in the third batch, only four moths emerged and all moths were pebrinised. Infected moths had deformed wings, and some are unable to emerge from pupal case. Larval mortality ranged from 19.6 to 30.3 % (Average = 23.2 %) and pupal mortality was 36.0 to 69.5 % (Average = 55.2 %). When the spore dose was reduced ten times by using the infective spore suspension with 3.9×10^6 spores / ml, moth emergence increased, but all moths were pebrinised. Moth emergence was 27.5 and 25.6 %, when spore suspension with 3.9×10^5 and 3.9×10^4 spores / ml, respectively, were used to infect leaf-roller caterpillars. All the moths were pebrinised. These observations suggest that, when pebrine spore infection is induced during early larval stage, namely the second instar, total mortality occurs in larval or pupal stages. When infection is induced during III instar, moth emergence occurs and infection is carried over to moth stage. When the spore dose is reduced, moth emergence increases and all moths were found pebrinised.

Table I. Susceptibility of *Diaphania pulverulentalis* to pebrine spores.Tableau I. Sensibilité de *Diaphania pulverulentalis* aux spores de pébrine.

Batch No	No of caterpillars fed on pebrine spores	Larval instar	Spore load (spores/ml)	Larval mortality (%)		Pupal mortality due to pebrine (%)	Moth infection (%)
				Pebrine	Other reasons		
N° de lot	Nb de chenilles nourries de spores de pébrine	Age larvaire	Qtité spores (spores / ml)	Mortalité larvaire (%)		Mortalité pupale due à la pébrine	Infection des papillons (%)
				Pébrine	Autres raisons		
1	80	II	3.9×10^7	16.3	37.5	46.2	-
2	40	II	3.9×10^7	27.5	17.5	55.0	-
3	36	II	3.9×10^7	30.6	11.1	58.3	-
4	32	II	3.9×10^7	15.6	40.6	43.8	-
5	50	I	3.9×10^7	20.0	20.0	60.0	-
6	46	III	3.9×10^7	11.6	10.9	69.5	-
7	50	III	3.9×10^7	30.0	30.0	36.0	4.0
8	40	III	3.9×10^6	22.5	42.5	25.0	10.0
9	40	III	3.9×10^5	22.5	45.5	5.0	27.5
10	39	III	3.9×10^4	17.9	51.3	5.2	25.6

Fig. 1. Infection of *Bombyx mori* with pebrine spores isolated from pebrinised *Diaphania pulverulentalis*.

M: Moths; P: Pupae; L: Larvae; IC: Infected control.

Fig. 1. Infestation de *Bombyx mori* avec des spores de pébrine isolées sur *Diaphania pulverulentalis* pébrinisée.

M: Papillons; P: Papes; L: Larves; IC: Témoin infesté.

(ii) Susceptibility of *B. mori* to pebrine spores isolated from *D. pulverulentalis*:

B. mori of race N B₄ D₂ was found infected when II instar silkworms were fed on mulberry leaves contaminated with pebrine spores isolated from infected *D. pulverulentalis* caterpillars in the laboratory (Fig. 1). All silkworms died in larval stage due to pebrine disease when they were infected with spore suspension with 5.6×10^6 and 5.6×10^7 spores / ml. When silkworms were fed on mulberry leaves contaminated with pebrine spore suspension with 5.6×10^5 and 5.6×10^4 spore / ml, larval mortality due to pebrine disease was 97.5 and 15.5 %, pupal mortality was 1.5 and 12.5 %, and silk moth emergence was 1.0 and 72.0 %, respectively. These results indicate that, when the spore load is high, total larval mortality occurs and when low, caterpillars and pupae are infected and moths emerged are also infected.

CONCLUSIONS

D. pulverulentalis is susceptible to *N. bombycis* due to secondary contamination in the laboratory. *B. mori* is susceptible to pebrine spores isolated from *D. pulverulentalis*. Considering the fact that the leaf-roller pest of mulberry has spread to seed areas also, the impact of infection of this pest with pebrine disease in the field, in these areas, can have serious consequences on sericulture industry.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr. S.B. Dandin, Director and Dr. R. Raghuraman, Divisional Chief, Sericulture Division, KSSRDI for facilities provided. Technical assistance of supporting staff of the Entomology section is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- ANONYMOUS 1984 Central Sericulture Research & Training Institute, Mysore, Annual Report, 1983-84.
- COLE R.J. 1970 The application of the 'triangulation' method for purification of *Nosema* spores from infected tissues. J. Invert. Path., 15: 193-195.
- GEETHA BAI M., MARIMADAI AH B., NARAYANASWAMY K.C. AND RAJAGOPAL D. 1997 An outbreak of leaf-roller pest, *Diaphania (Margaronia) pulverulentalis* (Hampson) on mulberry in Karnataka. Geobios New Reports, 16 (2): 73-79.
- ISHIHARA R. AND IWANO H. 1991 The lawn grass cutworm, *Spodoptera depravata* Butler, as a natural reservoir of *Nosema bombycis* Nageli. J. Seric. Sci. Japan, 60 (3): 236-237.
- IWANO H. AND ISHIHARA R. 1991 Isolation of *Nosema bombycis* from moths of the lawn grass cutworm, *Spodoptera depravata* Butler. J. Seric. Sci. Japan, 60 (4): 279-287.
- JOLLY M.S. 1986 Pebrine and its Control. CSR & TI Bulletin 5, pp 1-34.
- KASHKAROVA I.F. 1981 Nosematosis of the silkworm. Zashchita Rastenil, 9: 28-29.
- MACHAY M.L. 1957 Occurrence of *Nosema bombycis* Nageli among wild Lepidoptera. Folia Entomol. Hung., 10: 359-363.
- SRIKANTA H. K. 1987 Studies on cross infectivity and viability of *Nosema bombycis* Nageli (Microsporidia : Nosematidae). M.Sc. Thesis. University of Agricultural Sciences, Bangalore, India. pp 1-106.
- STEINHAUS E.A. 1949 Principles of Insect Pathology, McGraw Hill publications, New York, pp 546-632.

SENSIBILITE DU PARASITE DE LA TORDEUSE DU MURIER, *DIAPHANIA (MARGARONIA) PULVERULENTALIS* A *NOSEMA BOMBYCIS* DUE A UNE CONTAMINATION SECONDAIRE

M. GEETHA BAI & T. RAMEGOWDA

Karnataka State Sericulture Research and development Institute, Thalaghattapura,
Bangalore 560 062, Inde.

*Le parasite de la tordeuse du mûrier, **Diaphania (Margaronia) pulverulentalis** (Hampson) (Lepidoptera: Pyralidae) se trouve être sensible à **Nosema bombycis** nageli (Microsporida : Nosematidae), le pathogène causant la maladie de la Pébrine chez **Bombyx mori** L. due à une contamination secondaire en laboratoire. **B. mori** est sensible aux spores de Pébrine isolées des chenilles de **D. pulverulentalis** infestées. L'impact de la sensibilité du parasite de la tordeuse face à la maladie de la Pébrine sur l'industrie de la soie est débattu.*

INTRODUCTION

Le parasite de la tordeuse du mûrier, *Diaphania (Margaronia) pulverulentalis* (Hampson) (Lepidoptera : Pyralidae) a, pour la première fois, dévasté des mûraies au Karnataka, en Inde, en septembre 1995, cela c'est reproduit en 1996 (Geetha Bai et coll., 1997) et en 1997. *Nosema bombycis* Nageli (Microsporida : Nosematidae), le pathogène causant la maladie de la Pébrine chez le ver à soie *Bombyx mori* L. (Lepidoptera, Bombycidae), possède une vaste étendue d'hôtes (Steinhaus, 1949 ; Machay, 1957 ; Kashkarova, 1981 ; Srikanta, 1987 ; Jolly, 1986 ; Iwano and Ishihara, 1991). Iwano and Ishihara (1991) ont isolé *N. bombycis* des papillons de *Spodoptera depravata* Butler. Ce parasite est signalé comme étant un réservoir naturel de *N. Bombycis* au Japon (Ishihara and Iwano, 1991). Certains parasites du mûrier sont sensibles aux pathogènes du ver à soie. *Spilosoma obliqua* (Walker), (Lepidoptera : Arctiidae), *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera : Noctuidae) et *Euproctis fraterna* (Lepidoptera : Lymantriidae) se sont avérés être sensibles à *N. bombycis*, causant la terrible maladie de la Pébrine chez les vers à soie (Anonymous, 1984). Lors de nos recherches, la sensibilité de *D. pulverulentalis* aux spores de *N. bombycis* isolées à partir de *B. mori* et la sensibilité de *B. mori* aux spores de *N. bombycis* isolées à partir de *D. pulverulentalis* due à une contamination secondaire ont été testées en laboratoire ; les résultats sont présentés dans cet article.

MATERIELS ET METHODES

Une suspension de *N. bombycis* utilisée dans cette étude a été obtenue par la méthode de triangulation à partir de tissus homogénéisés de *B. mori* infesté (Cole, 1970). La sensibilité de *D. pulverulentalis* a été étudiée en nourrissant des chenilles du second et troisième stade larvaire avec des feuilles de mûrier enduites d'une suspension de spores (nombre de spores déterminé) isolée de *B. mori*. Un ml de spores en suspension par 50 larves a été utilisé pour infester un nombre précis de chenilles tordeuses du second et troisième âges larvaires réparties en 10 lots. Une suspension de spores a été étalée sur des feuilles de mûrier que l'on a ensuite séchées à l'air libre. Les chenilles testées ont

été affamées pendant 24 heures priorité étant faite à la nourriture infestée. Après que les feuilles enduites de la suspension de spores de Pébrine aient été mangées par les chenilles, des feuilles de mûriers fraîches sans spores de Pébrine ont servi de nourriture au vers à soie jusqu'à la pupaison. Toutes les chenilles mortes ainsi que les nymphes et les papillons ont été examinés par rapport aux spores de Pébrine et les résultats ont été relevés.

Les spores de *N. bombycis* isolés de *D. pulverulentalis* infesté avec la méthode de triangulation ont été utilisées pour tester la sensibilité de *B. mori*. Les vers à soie du deuxième âge de la race NB₄D₂ ont été utilisés pour ce test. Deux ml de suspension de spores de Pébrine, c'est à dire $5,6 \times 10^4$, $5,6 \times 10^5$, $5,6 \times 10^6$, et $5,6 \times 10^7$ spores / ml ont servi à enduire les feuilles de mûrier que l'on a donné aux vers à soie après la première mue. La nourriture infestée a été suivie d'une nourriture saine et l'élevage a continué. Les vers à soie témoins ont été nourris des feuilles de mûrier enduites d'une suspension de spores de Pébrine à 2 ml, $3,9 \times 10^7$ spores / ml, isolés des vers à soie. Pour les témoins non infestés, les vers à soie ont été nourris des feuilles de mûrier enduites d'eau. Dans chaque lot testé se trouve 50 vers à soie et chaque traitement a été reproduit quatre fois.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Sensibilité de *D. pulverulentalis* :

D. pulverulentalis, un important parasite du mûrier au Karnataka s'est trouvé être sensible à *N. bombycis* en laboratoire (tableau I). Lorsque 188 chenilles de *B. mori* du deuxième âge, placées dans quatre lots différents ont été nourries de feuilles de mûrier enduites d'une suspension de spores de Pébrine d'un ml avec $3,9 \times 10^7$ spores / ml / 50 larves, nous avons remarqué une forte mortalité des larves et des nymphes due à la maladie de la Pébrine. La mortalité larvaire allant de 15,6 à 30,6 % (Moyenne = 22,5 %). Les larves *D. pulverulentalis* infestées par la Pébrine ont peu d'appétit. Elles rétrécissent et des inégalités apparaissent à cause d'un développement différent. La mortalité chez les nymphes est plus importante que chez les larves, la mortalité nymphale étant de 43,8 à 58,3 % (Moyenne = 50,83 %). Les nymphes infestées par le parasite de la tordeuse sont d'un brun foncé et sont molles en comparaison avec des nymphes saines. *D. pulverulentalis* meurt durant le cycle larvaire ou nymphale. Lorsque 146 chenilles tordeuses du troisième âge dans trois lots ont été nourries de nourriture infestée avec une suspension de spores d'un ml avec $3,9 \times 10^7$ spores / ml / 50 larves, elles moururent toutes au stade larvaire ou nymphal dans les deux premiers lots, tandis que dans le troisième, quatre chenilles seulement émergèrent et tous les papillons furent pébrinisés. Les papillons infestés eurent les ailes déformées, certains furent incapables de sortir du stade nymphal. La mortalité larvaire varie de 19,6 à 30,3 % (Moyenne = 23,2 %) et la mortalité nymphale de 36,12 à 69,5 % (Moyenne = 55,2 %). Lorsque la dose de spores est réduite dix fois en utilisant une suspension de spores de $3,9 \times 10^6$ spores / ml, l'émergence de papillons augmente, mais tous les papillons sont pébrinisés. L'émergence des papillons est de 27,5 et 25,6 % lorsque la suspension en spores de $3,9 \times 10^5$ et $3,9 \times 10^4$ spores / ml, respectivement, a été utilisée pour infester les chenilles tordeuses. Tous les papillons sont pébrinisés. Ces observations suggèrent que lorsque l'infestation de spores de Pébrine est induite lors des premiers stades larvaires, à savoir le deuxième âge, une mortalité totale survient aux stades larvaire et nymphal. Lorsque l'infestation est induite lors du troisième âge, l'émergence de papillon se produit mais l'infestation est reportée au stade du papillon. Lorsque la dose en spores est réduite, l'émergence des papillons augmente mais tous les papillons sont pébrinisés.

2. Sensibilité de *B. mori* aux spores de Pébrine isolées de *D. pulverulentalis* :

B. mori de la race NB₄D₂ a été infesté lorsque les vers à soie du deuxième âge ont été nourris de feuilles de mûrier contaminées par des spores de pégrine isolées de chenilles *D. pulverulentalis* infestées en laboratoire (Fig. 1). Tous les vers à soie sont morts au stade larvaire à cause de la maladie de la Pébrine lorsque ils ont été infestés par une suspension de spores de $5,6 \times 10^6$ and $5,6 \times 10^7$ spores / ml. Lorsque les vers à soie ont été nourris de feuilles de mûrier contaminées avec une suspension de

spores de Pébrine à 5.6×10^5 et 5.6×10^4 spores / ml, la mortalité larvaire due à la maladie de la Pébrine est de 97,5 et 15,5 %, la mortalité nymphale est de 1,5 et 12,5 %, et l'émergence de papillons est de 1,0 et 72,0 %, respectivement. Ces résultats indiquent que lorsque le chargement en spores est élevé, la mortalité larvaire totale se produit et lorsque il est bas, les chenilles et nymphes sont infestés, les papillons le sont aussi.

CONCLUSIONS

D. pulverulentalis est sensible à *N. bombycis* due à une contamination secondaire en laboratoire. *B. mori* est sensible aux spores de Pébrine isolées à partir de *D. pulverulentalis*. En considérant le fait que le parasite de la tordeuse du mûrier s'est propagé dans les régions de grainage également, l'impact de l'infestation de ce parasite avec la maladie de la Pébrine dans les mûraies, dans ces régions, peut avoir des conséquences sérieuses sur l'industrie séricicole.

NEW HOST PLANTS OF MUGA SILKWORM *ANTHRAEA ASSAMA* WESTWOOD

B.B. SINGHA & P.K. DAS

Regional Muga Research Station, Boko, Kamrup, Assam, Pin-781 123, India

Keywords : *Antheraea assama*, polyphagus, *Cinnamomum tamala*, *Cinnamomum camphora*

Muga silkworm *Antheraea assama* Westwood is a polyphagus sericigenous insect, mostly reared by the farmers of the North Eastern India, particularly of Assam for its golden coloured silk. Muga silkworm feeds on wide variety of host plants. So far, twelve species of host plants have been reported (Choudhury, 1981. Barah *et al.* 1992). Among them *Machilus bombycina* and *Litsaea polyantha* are the primary host plants while *Litsaea citrate*, *L. salicifolia*, *L. nitida*, *Magnolia sphenocarpa*, *Actinodaphne ovobata*, *Celestrus monosperma*, *Xenthosyhum rhesta*, *Gmelina arborea* and *Zisypus jujuba* are considered secondary.

Though, the latest reported species *Cinnamomum glaucescens* (Syn. *C. cecicodaphne* Meissn.) showed no significant difference on rearing performance (Barah *et al.*, 1992), its primary or secondary status of the host plant is yet to be established.

In addition to the above, the muga silkworm was found to feed on two other new host plants *Cinnamomum tamala* Nees, locally known as Tejpat and *Cinnamomum camphora* Nees, locally known as Kopur or Camphor plant.

Preliminary report of feeding on *C. tamala* was received from a farmer of Coochbehar, West Bengal, India, and to confirm it, rearing was conducted on *C. tamala* available at the campus of the State Forest School, Jalukbari, Assam. *C. camphora* available in the campus, like most of the host plants, is also aromatic in nature and belong to the family lauraceae. After preliminary trial of feeding, rearing was also conducted on *C. camphora* and the results were compared with that reared on the primary host plant *M. bombycina*. Comparison of the rearing performance (table I) showed that higher effective rate of rearing (ERR) was observed on *M. bombycina* (29 %) followed by *C. camphora* (19%) and *C. tamala* (16 %). Cocoon character was found better in *C. tamala* while no significant difference was observed between *C. camphora* and *M. bombycina*. The low ERR in *C. tamala* may be due to early instar mortality because of hard fibre content in the leaves.

Cinnamomum tamala nees (Syn. *C. albiflorum* Nees) is a moderate size tree. The leaves of this plant have economic importance as they are used as spices in cooking due to its aromatic values. Its distribution is reported from 3 000 to 7 800 ft., east of Suttle extending sparingly to near the Indus, Bhutan, Sikkim, Khasi Hills, Silhet, Tripura, Burma and also in Queensland in Australia (Brandis 1972 ; Hooker, 1980).

Cinnamomum camphora Nees & Ebermaier (Syn. *Laurus camphora* vera ver. camphor) is a small low branched tree with spreading crown, leaves with a pleasant camphoraceous odour, 2.5 - 4 by 1.2 - 2 inch, acuminate, dark green and shining above with greyish under surface. It is cultivated in garden in Shillong and many other districts but nowhere extensively (Kanjilal *et al.*, 1984).

Table I. Comparative rearing performance of Muga Silkworm on *Cinnamomum tamala*, *Cinnamomum camphora* and *Machilus bombycina*.

Tableau I. Comparaison de la performance d'élevage du ver à soie Muga sur *Cinnamomum tamala*, *Cinnamomum camphora* et *Machilus bombycina*.

Food plants	Larvae brushed (No)	Larval duration (days)	Cocoon harvested (No)	ERR (%)	Cocoon Wt. (g)	Shell Wt (g)	Silk ratio (%)
<i>Nourriture</i>	<i>Larves levées (Nb're)</i>	<i>Durée larvaire (jours)</i>	<i>Cocons récoltés (Nb're)</i>	<i>TEE (%)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (g)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>
<i>C. tamala</i>	500	39	80	16	4.10	0.345	8.41
<i>C. camphora</i>	500	39	95	19	3.87	0.265	6.84
<i>M. bombycina</i>	500	38	145	29	3.89	0.280	7.12

This is a first report of *C. tamala* and *C. camphora* as host plants of muga silkworm *Antheraea assama*. However, more systematic study is required to determine their primary or secondary status of the food plants.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to Shri N. K. Sinha, Director, State Forest School, Jalukbari, Assam for identifying the plant species.

REFERENCES

- BARAH A., ISA M.D., DEVNATH M. AND SAMSON M.V. (1992) A new host plant of the Muga silkworm, *Antheraea assama* Ww. *Sericologia* 32(3) 529-530.
- BRANDIS D. AND STEWART J.L. (1972) The forest flora of North West and Central Indian. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehradun, 374-376.
- BRANDIS D. (1978) Indian trees. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehradun, 532-534.
- CHOUDHURY S.N. (1981) Muga and silk Industry. Directorate of Seric. and Weaving, Govt. of Assam, 21-23.
- HOOKE J.D. (1980) The flora of British India. Bishen Singh, Mahendra Pal Singh, Dehradun, 5, 128 & 134.
- KANJILAL P.C., DE R.N. AND DAS A. (1984) Flora of Assam. 4, 56.

NOUVELLES PLANTES HOTES POUR LE VER A SOIE MUGA, *ANTHERAEA ASSAMA* WESTWOOD

B.B. SINGHA & P.K. DAS

Regional Muga Research Station, Boko, Kamrup, Assam, Pin-781 123, Inde.

Le ver à soie Muga, *Antheraea assama* Westwood, est un insecte séricigène polyphage élevé pour sa soie couleur or par les fermiers du Nord Est de l'Inde, plus particulièrement en Assam. Le ver à soie Muga se nourrit d'une grande variété de plantes hôtes. Ainsi, douze espèces de plantes hôtes ont été relevées (Choudhury, 1981 ; Barah et coll., 1992). Parmi celles-ci, *Machilus bombycina* et *Litsaea polyantha* sont les plantes hôtes primaires alors que *Litsaea citrate*, *L. salicifolia*, *L. nitida*, *Magnolia sphenocarpa*, *Actinodaphne ovobata*, *Celestrus monosperma*, *Xanthosylum rhesta*, *Gmelina arborea* et *Zisypheus jujuba* sont considérées comme secondaires.

Bien que les dernières espèces signalées *Cinnamomum glaucescens* (Syn. *C. cecicodaphne* Meissn.) n'ont pas montré de différences significatives concernant le résultat de l'élevage, le statut primaire ou secondaire de la plante hôte reste cependant à établir.

De plus, il se trouve que le ver à soie Muga se nourrit sur deux nouvelles plantes hôtes, *Cinnamomum tamala* Nees, localement connue sous le nom de Tejpat et *Cinnomomum camphora* Nees, localement connue sous le nom de Kopur ou Camphre.

Un rapport préliminaire concernant l'alimentation sur *C. tamala* a été envoyé par un fermier de Coochbehar (W.B.) et afin de le vérifier, un élevage a été mené sur *C. tamala* disponible sur le campus de State Forest School, Jalukbari, à Assam. *C. camphora*, disponible sur le campus comme la plupart des plantes hôtes, est une plante par nature aromatique et appartient à la famille des Laureaceae. Après des essais préliminaires d'alimentation, l'élevage a été mené sur *C. camphoru* et les résultats ont été comparés avec ceux obtenus sur la plante hôte primaire *M. bombycina*. La comparaison des résultats de l'élevage (tableau I) a montré qu'un taux effectif d'élevage plus élevé (TEE) a été observé sur *M. bombycina* (29 %) suivi par *C. camphora* (19 %) et *C. tamala* (16 %). La caractéristique du cocon est meilleure chez *C. tamala* tandis qu'une différence peu significative a été remarquée entre *C. camphora* et *M. bombycina*. Le faible TEE chez *C. tamala* peut être dû à la mortalité au premier stade larvaire à cause des fibres épaisses contenues dans la feuille.

Cinnamomum tamala nees (Syn. *C. albiflorum* Nees) est un arbre de petite taille. Les feuilles de cette plante ont une importance économique car elle sont utilisées comme épice pour ses valeurs aromatiques. On en trouve entre 3 000 à 7 800 pieds d'altitude à l'est de Sutlej, s'étendant jusqu'à l'Indus, Bhutan, Sikkim, Khasi Hills, Silhet, Tripura, la Birmanie mais aussi au Queensland en Australie (Brandis 1972 ; Hooker, 1980).

Cinnamomum camphora Nees & Ebermaier (Syn. *Laurus camphora* fera ver. camphor) est un arbrisseau aux branches basses avec un sommet étalé, les feuilles qui dégagent une odeur plaisante de camphre, 2,5 - 4 par 1,2 - 2 cm, sont acuminées, de couleur vert foncé, brillantes sur le dessus, grisâtre sous la surface. Cet arbrisseau est cultivé dans les jardins de Shillong et beaucoup d'autres districts mais pas de manière extensive (Kanjilal et coll., 1984).

Ceci est le premier rapport concernant *C. tamala* et *C. camphora* en tant que plantes hôtes du ver à soie Muga *Antheraea assama*. Cependant, une étude systématique est nécessaire pour déterminer le statut primaire ou secondaire de ces plantes hôtes.

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux, soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante:

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.
- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.
- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.
- Remerciements.
- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4^{ème} édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. J. Serie. Sci. Jpn. Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 × 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés à part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés à part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 25 tirés à part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.
- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.

- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in Arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 × 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 25 free reprints are sent by the Editor.

* * *