

# 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**

**B. MAUCHAMP**  
**G. CHAVANCY**  
**A. FOURNIER**

**Managing Director**  
**Chief Editor**  
**Deputy Editor**

## **COMITE DE REDACTION** **EDITORIAL BOARD**

AKAPANTHU S. (Thaïlande / *Thailand*)  
BOSQUET G. (France)  
CAPPELLOZZA L. (Italie / *Italy*)  
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*)  
FREDDI G. (Italie / *Italy*)  
GOLDSMITH M.R. (USA)  
HE K. (Chine / *China*)  
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*)  
MACHII H. (Japon / *Japan*)  
MANO Y. (Japon / *Japan*)  
MAUCHAMP B. (France)  
MIRANDA J. E. (Brésil / *Brazil*)  
REALI G. (Italie / *Italy*)  
SHIMURA K. (Japon / *Japan*)  
SOMASHEKAR T.H. (Inde / *India*)  
SONWALKAR T.N. (Inde / *India*)  
TAKEDA S. (Japon / *Japan*)  
TAZIMA Y. (Japon / *Japan*)  
TRENCZEK T. (Rép. tchèque / *Czech Republic*)  
VAGO C. (France)  
VEY A. (France)  
YAMASHITA O. (Japon / *Japan*)

## SOMMAIRE – CONTENTS

## Revue / Review

- Blight diseases of mulberry (*Morus* spp.) – a review . . . . . 231**  
 Les maladies de la flétrissure du mûrier (*Morus* spp.) . . . . . 247  
 D. D. SHARMA, N. B. CHOWDARY, V. NISHITA NAIK, MALA V. R. & S. B. DANDIN

## Article scientifique / Scientific paper

- Detection and identification of phytotoxic substances from mulberry leaves inoculated with *Myrothecium verrucaria*, a pathogen of *Myrothecium* leaf spot of mulberry . . . 257**  
 Détection et identification de substances phytotoxiques dans les feuilles de mûrier inoculées avec *Myrothecium verrucaria*, un pathogène de la tache de la feuille *Myrothecium* du mûrier . . . . . 271  
 R. MURAKAMI, S. HIRADATE, A. SHIRATA & W. MITSUHASHI

## Rapports techniques / Technical reports

- Studies on reeling – Part I. Effect of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on reeling performance of Indian multibivoltine cocoons . . . . . 277**  
 Etudes sur le dévidage – Première partie. Effet des conditions de cuisson et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur la performance de dévidage des cocons polybivoltins indiens . . . . . 287  
 SUBHAS V. NAIK & T. H. SOMASHEKAR

- Studies on reeling – Part II. Effect of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on quality characteristics of raw silk of Indian multibivoltine cocoons . . . . . 293**  
 Etudes sur le dévidage - Deuxième partie : Effet des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur les caractéristiques qualitatives de la soie grège chez les cocons polybivoltins indiens . . . . . 303  
 SUBHAS V. NAIK & T. H. SOMASHEKAR

- Mulberry leaf enrichment through Kohiko Silcare feed supplement and its effect on rearing performance of silkworm hybrid . . . . . 309**  
 Enrichissement de la feuille de mûrier grâce au supplément alimentaire Kohiko Silcare et étude de son effet sur la performance d'élevage de vers à soie hybrides . . . . . 315  
 T. K. NARAYANASWAMY, M. A. SHANKAR & B. SANNAPPA

- Comparative assessment of certain bed disinfectants in containing the major diseases in tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. . . . . 319**  
 Evaluation comparative de certains désinfectants de litière pour lutter contre les principales maladies du ver à soie tasar, *Antheraea mylitta* D. . . . . 325  
 ALOK SAHAY, G. P. SINGH, D. K. ROY & B. R. P. SINHA

## Notes brèves / Brief notes

**Studies on seed (egg) production with reference to mating behaviour of muga silkworm, *Antheraea assama* Westwood . . . . . 329**

Etudes sur la production d'œufs en fonction du comportement d'accouplement du ver à soie muga, *Antheraea assama* Westwood . . . . . 335  
INDRAJIT BISWAS & NILAY RAY

**Study on some economic characters of different colour polymorphs of muga silkworm (*Antheraea assamensis* Helfer) . . . . . 339**

Etude de certains caractères économiques de différents polymorphes de couleur du ver à soie muga (*Antheraea assamensis* Helfer) . . . . . 343  
A. BHATTACHARYA, A. K. SAHU, B. C. PRASAD & R. CHAKRABORTY

**Reaction of different cultivars of *Persea bombycina* Kost towards leaf spot disease caused by *Phyllosticta persea* Ell. & Mart . . . . . 345**

Réaction de différents cultivars de *Persea bombycina* Kost à la maladie de la tache de la feuille provoquée par *Phyllosticta persea* Ell. & Mart . . . . . 349  
RANJANA DAS, K. DAS. & R. CHAKRAVORTY

## BLIGHT DISEASES OF MULBERRY (*MORUS* SPP.) - A REVIEW

D. D. SHARMA, N. B. CHOWDARY, V. NISHITHA NAIK, MALA V. R. & S. B. DANDIN

Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Mysore-570008, India

*Mulberry (*Morus* spp.) is a perennial crop cultivated for its foliage to rear the silkworm (*Bombyx mori* L.). The crop is affected by many of foliar diseases, among which various blight diseases caused by different pathogens are the most serious diseases and cause leaf yield loss up to 15 % besides deteriorating the leaf quality. The blight symptoms are manifested on various parts of plants i.e., leaf, stem, shoot, bud etc. A number of blight diseases such as *Alternaria* leaf blight, *Fusarium* leaf blight, *Helminthosporium* leaf blight, *Colletotrichum* leaf blight, *Sclerotium* blights, bud blight, twig blight, branch blight, leaf roll blight, bacterial leaf blight and so on caused by various fungal and bacterial pathogens were reported on mulberry from various parts of the world. An appropriate timely control measures are needed to avoid quantitative and qualitative leaf yield loss in mulberry due to blight diseases. Keeping this in view various aspects related to blight disease i. e., symptomatology, epidemiology, disease cycle and control measures are reviewed in this paper.*

**Key words:** Blight diseases, mulberry, symptomatology, fungi, bacteria.

### INTRODUCTION

Diseases are one of the major limiting factors in successful cultivation of many crops including mulberry (*Morus* spp.). Mulberry is a perennial plant cultivated as bush or tree for its foliage to rear silkworms in tropical and subtropical countries. The crop is vulnerable to various diseases caused by fungi, bacteria, viruses, mycoplasma like organisms, nematoda, etc. These diseases are either airborne (foliar diseases) or soilborne (root diseases) in nature reducing the leaf yield up to 20% besides deteriorating the quality. Major diseases affecting the foliage are leaf spot, powdery mildew, leaf rust and blight. Surveys conducted by various authors have revealed that blight diseases are prevalent throughout the year in all the countries where sericulture is practiced causing substantial loss in leaf yield both under rainfed and irrigated cultivation systems (Teotia and Sen, 1994; Gunasekhar *et al.*, 1994a; Philip *et al.*, 1994; 1997; Minamizawa, 1997; Maji and Qadri, 1999; Ertian, 2003). The blight appears in the form of browning/ blackening/burning of various parts of plants like leaf, stem and bud. Both fungi and bacteria are reported to cause various blight diseases in mulberry. Based on the symptoms appearing on various parts of the plant, the blight diseases are named as leaf blight, stem blight, twig blight, trunk blight, shoot blight, bud blight, etc. Blight incidence is more severe in when plants are cultivated under closer spacing system and affects the nutritional value of leaf by reducing moisture, protein, chlorophyll content and total sugars. Feeding silkworms with infected/nutritionally imbalanced leaves adversely affects yield and commercial characters of cocoon (Rao *et al.*, 1981; Sastry, 1984; Siddaramaiah and Hegde, 1990; Raju, 1998). This review elucidates the research so far conducted on various blight diseases of the mulberry and the priority areas for future research are also identified, as much work remains to be done on the management of the blight diseases.

## FUNGAL LEAF BLIGHT

The fungal leaf blight caused by various species of *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium* and *Colletotrichum* belonging to various genera is prevalent mainly in tropical regions. The leaf blight caused by species of *Alternaria* and *Fusarium* is most prevalent in India, China and Japan (Philip *et al.*, 1994; Minamizawa, 1997; Gupta, 2001; Ertian, 2003) whereas blight caused by species of *Colletotrichum* and *Helminthosporium* are prevalent in India (Gupta *et al.*, 1997; Latha *et al.*, 2000). These fungal leaf blights cause leaf yield loss up to 10% deteriorating the leaf quality. Based on the fungal pathogens the leaf blights are categorized as follows.

### (i) *Alternaria* leaf blight:

Occurrence of mulberry leaf blight caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler belonging to the family Dematiaceae, order Moniliales of class Deuteromycetes was first time reported by Gunasekhar *et al.* (1994b) from India. Though the disease is more prevalent in peninsular India throughout the year, the severity of disease is more remarkable during summer season. Temperature of 25-30° C and relative humidity of 40-60 % are favourable for the outbreak of the fungal blights (Raju, 1998).



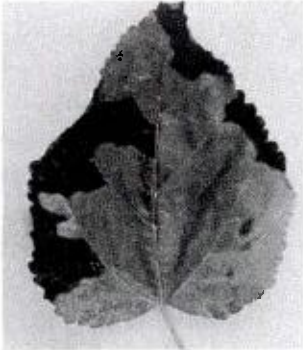
*Alternaria* leaf blight

*Flétrissure de la feuille Alternaria*  
(*A. alternata*)

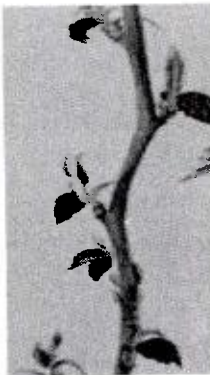
The disease is characterized by drying (blackening/browning) of the leaves starting from the leaf tip and extending to the base, covering the entire leaf lamina, and then to the petiole. As disease advances, severely affected leaves wither and fall-off. The inoculum is mainly air-borne, spreading by means of conidia, which infect the leaves causing deterioration of tissues leading to blight symptoms. Conidiophores and conidia of the fungus are yellowish-brown in colour. Conidia are narrow, ovoid to ellipsoidal, measuring 8-12 26-27 m, with 3-8 transverse septa and 1-3 longitudinal septa. Conidia germinate by producing more than one germ tube, which terminate into finger-like projections called appressoria. These appressoria help the pathogen to enter the leaf tissue by direct penetration through leaf cuticle and epidermis or through wounds (Gupta *et al.*, 1998). *Alternaria* remains dormant in infected leaves and survives in soil on plant debris infecting the new crop when the conditions are congenial. Among the various fungicides used for the control of *Alternaria* blight, foliar spray of 0.2 % Dithane M-45 (mancozeb 75 % WP) has been found to be effective against the disease. Bioagents like *Trichoderma harzianum*, *T. pseudokoningii* and *Gliocladium virens* inhibited the mycelial growth of *A. alternata* up to 75 % under *in vitro* conditions (Raju, 1998).

### (ii) *Fusarium* leaf blight:

Various species of *Fusarium* belonging to the order Moniliales of class Deuteromycetes cause leaf blight in mulberry. The perfect stage of this fungus is *Gibberella baccata* (Ces. et De Not.) Sacc. var. *moricola* class Ascomycetes. However, in India, *F. pallidoroseum* (Cooke) Sacc., *F. lateritium* Nees. f. sp. *mori* (Desm.) Matuo et Sato, *F. moniliforme* Sheldon var. *intermedium* Neish et Laggett and *F. solani* (Mart.) Sacc. are reported to cause leaf blight in mulberry saplings and established plants (Sukumar and Padma, 1999). *F. lateritium* f. sp. *mori*, *F. oxysporum* Schlecht. and *F. solani* also cause leaf blight of mulberry in other sericultural countries (Saito *et al.*, 1978; Ali and Ahmed, 1987; Govindaiah *et al.*, 1990; Gupta, 2001; Ertian, 2003). Among them, leaf blight caused by *F. pallidoroseum* and *F. lateritium* f. sp. *mori* are more prevalent. The disease is noticed all over India



***Fusarium* leaf blight.**  
**Flétrissure de la feuille *Fusarium***  
**(*F. pallidoroseum*)**



***Colletotrichum* leaf blight**  
**Flétrissure de la feuille *Colletotrichum***  
**(*C. gloeosporioides*)**

and Japan during summer and rainy seasons (Saito *et al.*, 1978; Raju, 1998). Srikantaswamy *et al.* (2000) reported that the leaf blight caused by various species of *Fusarium* is directly related to crop age and the maximum disease index was observed at leaf harvest stage (70 days after pruning).

Temperature, relative humidity and crop age were positively correlated and significantly contributed towards disease development. The symptoms of *Fusarium* leaf blight first appear as marginal browning or blackening of leaves from edge of lamina, which later spread towards midrib, leading to defoliation. The fungal hyphae give rise to simple conidiophores, which produce two types of conidia *i.e.*, micro and macro. Micro conidia are single celled and ovoid/oblong in shape. Macro conidia are hyaline, elongated, filiform and multiseptate with pointed ends, measuring  $14.3 \times 5.02 \mu\text{m}$ . Each macro-conidium gives rise to several germ tubes, which grow and penetrate the mulberry leaf directly through stomata without developing appressoria or any other specialized penetration structure (Gupta *et al.*, 1998). The pathogen is air and soil inhabitant and survives in crop debris in the form of chlamydospores. Various fungicides have been used for the control of *Fusarium* blight. Foliar spray of 0.2 % Dithane M-45 has been found effective against the disease. Bioagents like *Trichoderma harzianum*, *T. pseudokoningii* and *Gliocladium virens* inhibited the mycelial growth of *F. pallidoroseum* up to 80 % under *in vitro* conditions (Raju, 1998).

### **(iii) *Colletotrichum* leaf blight:**

Severe infection of saplings in nursery beds by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig et Sacc. causing leaf blight disease was reported from India (Gupta *et al.*, 1997; Gupta, 2001). The fungus belongs to the class Deuteromycetes.

The disease appears as blackening or burning of sprouted leaves from the saplings and the growth is affected. The young/ tender leaves of 2-3 month old mulberry saplings were found to be highly susceptible and under severe conditions lead to the death of the saplings. The pathogen survives on dead host tissues in soil, which serve as primary source of inoculum (Gupta and Sarkar, 1999). The disease spreads in the field through contaminated soil, irrigation water, cultivation tools and wind borne inoculum. The fungus produces conidia on conidiophore. Conidia are ovoid/oblong, hyaline and unicellular measuring  $12.2\text{--}15.9 \mu\text{m}$  (average  $14.2$ )  $\times$   $2.8\text{--}3.75 \mu\text{m}$  (average  $3.5$ ). The pathogen overwinters in the form of acervuli and mycelia in infected

leaves and soil. Under favourable conditions, the conidia germinate and infect the saplings. The infection of disease could be prevented by removal and burning of diseased leaves/branches. Further, before plantation of cuttings in nursery beds soaking of them in 0.1% solution of mancozeb 75 % WP for 30 minutes is helped to avoid disease spread (Gupta and Sarkar, 1999).

**(iv) *Helminthosporium* leaf blight:**

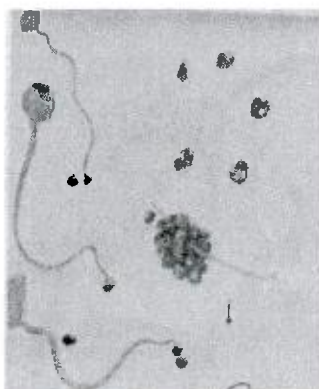


The disease is caused by *Helminthosporium tetramera* McKinney belonging to class Deuteromycetes and reported from India (Latha *et al.*, 2000). The intensity of disease is noticed during rainy season and leaf yield loss is up to 6%. The disease is favoured by moderate relative humidity (more than 50 %) and temperature of 20-30° C. The symptoms are withering and drying of leaves. The dried portions turn to ash colour. The withering extends irregularly throughout the leaf surrounded by a thin margin of light brown colour. Rain splash, wind and insects disseminate the pathogen. The fungus overwinters in crop debris in the form of chlamydospores. It produces the conidia on conidiophores. Each conidium produces more than one germ tube, which penetrate the mulberry leaf through stomata or ruptured epidermis. So far, no control measures have been reported.

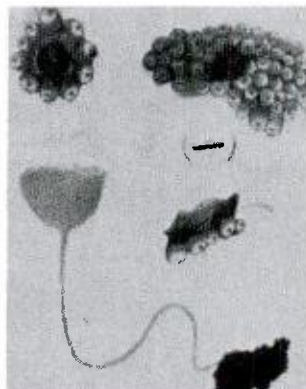
**(v) *Sclerotium* blights:**

The sclerotium blights are reported from China (Ertian, 2003).

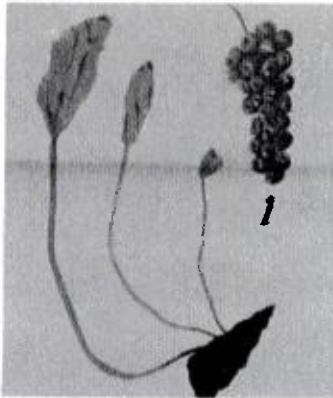
The pathogens affect the fruits of mulberry. The disease occurs in all the seasons and can be categorized in to three types *i. e.*, fatty sclerotium [*Ciboria shiraiana* (Henn) Wketzel], little sclerotium [*Ciboria carunculoides* (Siegler et Jenkins) Whetzel et Wolf] and small sclerotium [*Mitrula shiraiana* (Henn.) Ito et Imai].



**Fatty sclerotium**  
**Sclerotium gras**  
**(*Ciboria shiraiana*)**



**Little sclerotium**  
**Petit sclerotium**  
**(*C. carunculoides*)**



All the three pathogens belong to the order Helotiales of class Ascomycetes. Fatty sclerotium is characterized by swelling of mulberry fruits with discoloration and the diseased fruits emit alcoholic smell. The fruits become small, fat and ovary are the symptoms of little sclerotium. In the small sclerotium, the fruits become shrink, hard and fall off. All the pathogens overwinter in the form of apothecium in diseased fruits. Apothecium is cup shaped and has several asci. Each ascus has 8 ascospores, which are oval in shape and colourless. The ascospore germinates and spreads the disease. These diseases can be controlled by spraying of 0.1 % methyl thiophinate 70 % WP or 0.1 % vinyl thiophinate 50 % WP or 0.1 % carbendaxol 50 % WP (Govindaiah and Sharma, 1993; Ertian, 2003).

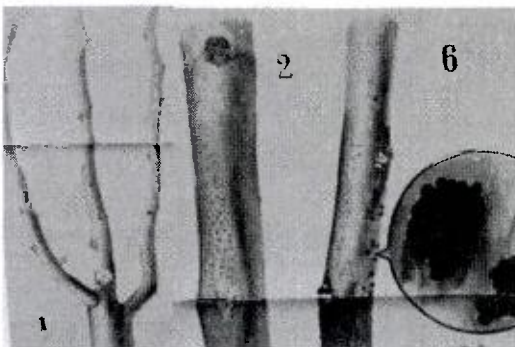
**Small sclerotium**  
**Sclerotium fin**  
**(*Mitrula shiraina*)**

**(vi) Bud blight :**

Bud blight caused by various species of *Fusarium* is prevalent in India, China and Japan.

The disease appears during seedling/sapling stage and in established plantations after leaf harvesting/pruning of the plant. During seedling stage, the bud blight is caused by *F. solani* (Mart.) Sacc. The symptoms appear on the young bud in the form of small water soaked spots, which turn brownish black in colour leading to blighting/browning of the growing buds (Siddaramaiah and Hegde, 1988).

In China, Japan and India, the bud blight in established crop is caused by *F. lateritium* var. *mori* (Nees) Desm. during the spring and winter seasons (Matsuo, 1952, 1953; Matuo, 1958; Shirata *et al.*, 1980; Sukumar and Yadav, 1988; Govindaiah and Sharma, 1993; Ertian, 2003). The disease is recognized by the appearance of dark brown oily spots near the bud. These spots enlarge, tissues rot



**Bud blight**  
**Flétrissure du bourgeon**  
**(*F. lateritium* var. *mori*)**

and young shoots wither off. The nodal region surrounding the buds gets discoloured and necrotized. The necrotic region extends both horizontally and vertically across the stem. Severely infected portions of bud become dry. The pathogen overwinters in the form of mycelium or conidia in the diseased branches. There are two stages such as imperfect (asexual stage) and perfect stage (sexual stage). *F. lateritium* var. *mori* is the imperfect stage while *Gibberella baccata* var. *moricola* is the perfect stage. The pathogen attacks the bud through wounds caused by wind, rain and insects. Temperature at 22-30° C with relative humidity of about 75-85 % favours the outbreak of disease. The disease can be minimized by plantation of disease resistant cultivars like Husang 5 and Tongxiangqin. Further, foliar spray of 0.2 % methyl thiophanate (70 % WP), lime sulphur and Captan are recommended for the control of the disease (Minamizawa, 1997; Sukumar and Padma, 1999; Ertian, 2003).



**Twig blight**  
*Flétrissure de la brindille*  
(*F. solani* f. sp. *mori*)

#### (vii) Twig blight:

Twig blight is caused by *Hypomyces* (*Fusarium*) *solani* f. sp. *mori* / *Hypomyces solani* f. sp. *pist* (Jones) Syd. et Hans. The perfect stage of this fungus is *Gibberella baccata* var. *moricola*. The occurrence of the disease is very common in China and Japan during winter and spring seasons. The incidence of 38-46 % was reported leading to reduction in silkworm rearing capacity up to 39% (Minamizawa, 1997; Ertian, 2003). The symptoms appear during winter and spring by two types of spots on the mulberry twigs. The first type of spots are dark oily in colour and diamond shape appearing on twigs during the winter buds. The second type of spots is watery ellipsoidal and brown coloured appearing near the wounded twigs. Both the types gradually expand and form dense minute eruptions. The disease can be prevented by removal of affected shoot and destroyed by burning and spraying of 0.05 to 0.1% Topzin M/Momiculin/Anles (Minamizawa, 1997). Ertian (2003) reported that planting of highly resistant varieties such as Tonguing black, Pear leaf large mulberry and Heigelu in disease prone areas can minimize the disease to a great extent.

#### (viii) Branch blight:

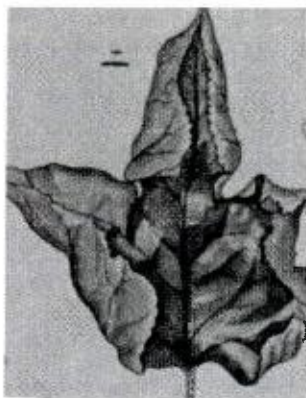
The branch blight is caused by *Fusicoccum mori* Yendo and is more prevalent in China during rainy and post rainy seasons. The fungus belongs to the class Deuteromycetes (Govindaiah and Sharma, 1993; Ertian, 2003). Generally, young shoots are affected by the pathogen. Blackish brown spots appear on the stem 2-3 cm above the ground. Later bark gets epidermis are rotten and plants die. The pathogen overwinters in the form of pycnidia in the diseased branch. The pathogen is a weak parasite invading through wounds and injuries. The mycelium grows intercellularly and forms fruiting bodies called pycnidium containing several pycnidiospores.



#### Branch blight

*Flétrissure de la branche (Fusicoccum mori)*

The pycnidiospores are oval to spherical measuring  $20-30 \times 1-1.2 \mu\text{m}$  in size. These pycnidiospores under favourable conditions germinate and infect the plant. Temperature of  $25-28^\circ \text{C}$  and RH of 85-90 % are favourable for the disease development. The disease can be managed by removing the diseased branches during winter and by scraping the diseased spots during spring. Further, spraying of 0.2 % carbendazim (70 % WP) or Topsin (70 % WP) after summer pruning is effective against the disease (Govindaiah and Sharma, 1993; Ertian, 2003).



#### Leaf roll blight

*Flétrissure par enroulement de la feuille (Hormodendrum mori)*

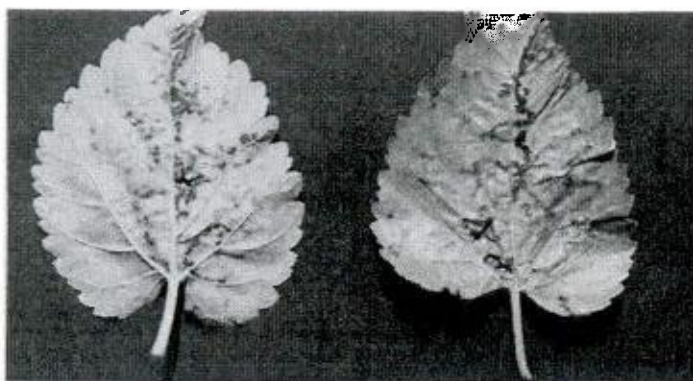
#### (ix) Leaf roll blight:

Leaf roll blight is also called leaf burn disease and some times as low sugar content disease. It is caused by *Hormodendrum mori* Yendo belonging to the order Hypomycetales of class Deuteromycetes. The disease generally affects tender leaves and is more prevalent during summer, autumn and spring seasons in China. In summer and autumn seasons top leaves are infected first by leaf margin burns and leaves turn brown in colour and rolled in the upwards direction. The brown spots absorb water and split during dry conditions. During spring except tip buds other buds fall off. The pathogen overwinters in the soil in the form of mycelium. The disease spreads through wind current and rain droplets. The fungus produces mycelium in which colorless conidiophores are produced. Temperature of around  $20-28^\circ \text{C}$  with 85% relative humidity favours the disease development. The disease can be controlled by spraying of 0.2 % carbendazim (70 % WP) or Topsin (70 % WP) after summer pruning (Govindaiah and Sharma, 1993; Ertian, 2003).

## BACTERIAL LEAF BLIGHT

The disease is caused by a bacterium, *Pseudomonas syringae* pv. *mori* (Boyer et Lambert) Young belonging to the order Pseudomonadales of class Schizomycetes. *Bacterium mori* (Boyer et Lambert) and *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Steven are synonyms of the *P. syringae* pv. *mori* (Maji and Qadri, 1999). The first occurrence of bacterial blight of mulberry was reported from Japan (Hori, 1906). Later, the disease was reported by Doidge (1915) from South Africa, Christoff (1930) from Bulgaria, Dowson (1932) from Tasmania, Sinha and Saxena (1966) from India, Amani and Akhavizadegan (1979) from Iran, Novak and Lanzova (1983) from Czechoslovakia, Zing *et al.* (1988) from China, Akthar and Sarwar (1988) from Pakistan, Fernandes (1999) from Portugal and Sahin *et al.* (1999) from Turkey. In India and Japan the disease is known as bacterial blight while in China it is familiar as black blight/shrinkage blight (Krishna Prasad and Siddaramaiah, 1978; Minamizawa, 1997; Ertian, 2003). Further, species of *Xanthomonas* like *X. campestris* pv. *mori* (Pommel) Dowson and *X. campestris* pv. *moricola* is another series of bacterial pathogen causing leaf blight of mulberry in India (Kore and Patil, 1985; Nagaraj, 1997; Maji *et al.*, 1998; Nagaraj *et al.*, 2000; Ravikumar *et al.*, 2004). Sharma *et al.* (2000) observed that *P. syringae* pv. *mori* and *X. campestris* pv. *mori* were found to be associated with bacterial blight disease causing disease complex. All types of bacterial blights are more prevalent during rainy season followed by winter season and about 8-12% leaf yield loss is observed every year besides deteriorating the leaf quality. Atmospheric temperature fluctuating between 20-30° C and high humidity (more than 80 %) are favourable for disease development while rainfall and relative humidity has direct relation with disease development (Sato and Takahashi, 1973; Takahashi, 1980; Zing *et al.*, 1988; Sengupta *et al.*, 1990; Teotia and Mandal, 1993; Teotia and Sen, 1994; Gunasekhar *et al.*, 1994a; Gangwar and Thangavelu, 1991; 1995; Sharma *et al.*, 2000). The disease drastically reduces feeding value of leaves (Sato and Takahashi, 1973).

The symptoms appear as numerous small water-soaked, irregular brown spots on the lower surface of leaves, which later spread to the upper leaf surface also. Under severe conditions, the spots become big and poly angular. Veins and veinlets become necrotic. Finally the leaves become curled, rotten and turn to brownish-black in colour. The leaves get crinkled, distorted, curved outward and fall prematurely (Krishna Prasad and Siddaramaiah, 1978; Minamizawa, 1997; Ertian, 2003).



**Bacterial leaf blight**

*Flétrissure bactérienne de la feuille*

(*Pseudomonas syringae* pv. *mori*)

The symptoms associated with the disease complex caused by *X. campestris* pv. *mori* and *P. syringae* pv. *mori* (mixed population) are characterized by the appearance of numerous small sized water soaked blackish brown spots surrounded with halo margins on the lower surface of the leaves, which later develop on the upper surface (*X. campestris* pv. *mori*). Later, large angular pustules of brown colour appear, which coalesce and form large irregular necrotic areas (*P. syringae* pv. *mori*). Microscopic examination of the diseased tissues reveals exudation of whitish-yellow bacterial mass (Maji *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2000).

Soil is the primary source of infection. The secondary infection takes place through irrigation and cultivation practices. Bacterium (*P. syringae* pv. *mori*) is Gram negative, rod-shaped, motile bipolar monotrichous/multitrichous with flagella measuring 1.8 to 4.5  $\mu\text{m}$  in length and 0.9 to 1.3  $\mu\text{m}$  in breadth. It produces creamish-white, round and shiny colonies on nutrient agar medium. It liquefies gelatin and turns litmus milk into alkaline. It is not capable of producing nitrites from nitrates, showing negative starch hydrolysis and utilizing xylose (Sato *et al.*, 1971; 1981; Tourkoglu and Oktem, 1973; Takahashi, 1980; Maji and Qadri, 1999; Sharma *et al.*, 2000). *X. campestris* pv. *mori*, produces yellow coloured highly mucilaginous colonies on nutrient agar medium. These colonies are convex, shiny and circular with entire margins. The bacterium is Gram negative, rod shaped with single polar flagellum, occurring singly or in pairs, encapsulated, showing positive starch hydrolysis, gelatin, catalase and casein reactions whereas negative in reaction with oxidase (Maji *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 2000). Pathogen invades through stomata and wounds caused by wind, rain, insect attack and cystolith (Govindaiah and Sharma, 1993; Gupta *et al.*, 1995). The bacterium over winters for longer duration in soils, dead roots and leaves (Sato and Takahashi, 1972; Kubomura and Nakayama, 1975). After entering in leaf tissue, it multiplies and spreads intercellularly at a rapid rate causing characteristic symptoms on plants.

Pruning of young mulberry trees during autumn followed by spraying of Bordeaux mixture was recommended as a control measure against bacterial blight disease (Dowson, 1957). Chanturia and Labakhua (1963) reported that spray of 0.05 - 0.1% phyto bacteriomycin containing 1% glycerin was more effective than Bordeaux mixture for the control of the disease. Gvinepadze *et al.* (1978) reported that Benomyl and Dithane M-45 are highly effective against the pathogen. Agricultural antibiotics like Streptomycin, mixture of copper - streptomycin (0.5 to 1.0%) and fungicides such as Benomyl or Dithane M-45 are effective against the bacterial blight (Takahashi, 1975; 1980; Krishna Prasad and Siddaramaiah, 1978; Sharma and Govindaiah, 1991). The efficacy of various plant products have also been tested under *in vitro* conditions against *P. syringae* pv. *mori* and *X. campestris* pv. *mori*. Among them, Neem gold (Azadirachtin 0.15% EC) gave inhibition zone up to 28.3 mm (Sharma *et al.*, 2001). As far as host resistance to the disease is concerned the varieties like Bulgarian-3, Bulgarian-24, Thileseuri and Galicene from Romania exhibited some resistance to bacterial blight (Coteance, 1971). *M. indica* and *M. alba* cultivars, Husung, China, Shine ichinose, Gumji and Ichihie are reported to have a resistance both under field and laboratory conditions in Pakistan (Pathan, 1987; Akthar and Sarwar, 1988). In Japan mulberry varieties, Shimanouchi, Shinichinose, Minamisakari, Kenmochi and Roguwa are reported to be highly resistant to bacterial blight (Takahashi, 1980; Minamizawa, 1997). From India, varieties like Berhampore local, MR-2, S-54 found to be resistant among Indian varieties against bacterial blight (Gangwar and Thangavelu, 1995; Sharma, unpublished).

## MINOR FUNGAL/BACTERIAL BLIGHT DISEASES

The disease, which occurs occasionally and restricted to certain areas only, is called minor blight disease. Time-to-time a number of such diseases have been reported in India and abroad. In India, mulberry seedlings are found to be more vulnerable to the attack of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing seedling blight. The symptoms include drying of seedlings from leaf tip by burning, which is extended to the leaf base with brownish concentric rings at periphery and entering the main stem

with petiole within 10-15 days (Gunasekhar *et al.*, 1992). Fungal pathogens such as *Phoma exigua* (Dayakar Yadav and Sukumar, 1987), *Mycosphaerella ulmi* (Kleb.) (Misra *et al.*, 1994) and *Cladosporium chlorocephalum* (Fresen.) Mason et Ellis (Chowdary *et al.*, 2005) and bacterial pathogen like *X. campestris* pv. *mori* (Gupta *et al.*, 2001) are reported to cause shoot/stem blight disease in mulberry with an average intensity of 8 % in different mulberry varieties. *P. exigua* affects tender portions of stem causing discoloration and blackening of bark leading to sudden withering of branches and defoliation. *M. ulmi* is manifested as numerous reddish white lesions on the lower portion of mulberry twigs which later become hard, circular brick red to red lesions and cover the entire twig. *C. chlorocephalum* appears on tender stem of mulberry in the form of brownish black, round to oval spots, which irregularly spread to the entire shoot in severe condition, when the garden is affected with pest attack. As the disease progresses the affected portion becomes black and irregular in shape. Under severe conditions, the fungus causes death and decay of the affected tissues. *X. campestris* pv. *mori* appears as marginal burning of leaf lamina and spread to the stem/shoot resulting in drooping of the entire shoot. So far, no control measures have been reported for seedling blight and shoot/stem blight diseases except stem blight caused by *P. exigua*, which can be controlled by removal of infected branches and foliar spray of 0.2 % carbendazim (50 % WP) at the time of sprouting (Sukumar and Padma, 1999).

In Japan, Takahashi and Sato (1977) reported halo blight caused by a new strain of *Pseudomonas mori*. The disease appears as necrotic spot with halo on leaves and general chlorosis of young shoot. Dogare shoot blight caused by *Diaporthe nomurai* Hara, branch blight [*Stigmia mori* (Nomura) Shirata et Takahashi] and southern blight (*Corticium rolfsii* Curzi) are sporadic blight diseases. The symptoms appear on the shoot as circular, oval, spindle or irregular shaped markings with oily appearance whereas branch blight occurs in the shoot branch in the form of dark, blackish, brown tubercles. Burning of diseased shoots and avoiding open injuries to the shoots can prevent the disease. Southern blight appears in the form of rotting of shoot with sclerotial bodies of the fungus (Fukuchi and Mitsueda, 1982; Minamizawa, 1997). However, there are no reports in detail on the epidemiology and control measures of these pathogens.

## IMPACT OF AGRONOMICAL PRACTICES ON BLIGHT DISEASES

In India, various cultural/agronomical practices *i. e.*, plant spacing, pruning methods, balanced application of fertilizers, weed management etc. are known to reduce disease severity of fungal (*A. alternata* / *F. pallidroseum*) and bacterial blights (*P. syringae* pv. *mori*/*X. campestris* pv. *mori*) to some extent in mulberry. Planting of mulberry with wider spacing (90 × 90 cm) and paired row planting system (150 + 90 × 60 cm) helps to reduce the incidence of fungal and bacterial blights to an extent of 23-30% over the closer spacing (60 × 60 cm / 60 × 30 cm), which creates ideal condition for multiplication and spreading of pathogens (Sharma *et al.*, 1993; 1996). Similarly, about 21-25 % reduction of disease severity was observed under middle pruning (40 cm above the ground level) over basal pruning. Higher disease incidence in ground level pruned plots might be due to easy entry of pathogens/over wintering stage of pathogen present in soil/debris through cut ends of the plants (Sharma *et al.*, 1993; 1996). Significantly lesser incidence (40-45 %) of blight diseases is recorded under fertilizer application with high amount of phosphorus (300: 180:120 kg NPK), application of bacterial biofertilizers (BBF) and VAM over recommended fertilizer application (300: 120:120 kg NPK) (Sharma *et al.*, 1994; 1995; 1996; Govindaiah and Sharma, 2001). The weed control is important in disease management as they act as alternative hosts for various blight pathogens of mulberry. In the absence of mulberry leaves (after pruning/harvesting the leaves), these pathogens survive on many dicot weeds and are able to spread the disease to mulberry. The crop debris is one of the main sources of inoculum in mulberry garden. Crop debris left in the garden often possesses inoculum of the pathogens in the form of spores and mycelia, which remain inactive during unfavorable condition

and infect the plant when conditions become favourable. Hence debris should suitably be disposed either by burning or by composting (Sharma- unpublished).

### **EFFECT OF DISEASED LEAVES ON SILKWORM HEALTH**

Healthy growth and development of silkworms largely depends upon the quality of mulberry leaves fed. Many workers have reported that nutritional quality of mulberry leaves influence the growth and cocoon production to a great extent (Qadri *et al.*, 1998; 1999). Biochemical and physiological studies have revealed that blight affected mulberry leaves are poor in nutritive value due to reduction in leaf moisture, protein, sugar contents, etc. Feeding of blight infected leaves to silkworms affects the rearing, reeling and grainage parameters (Raju, 1998). The loss of economic characters might be due to the feeding of poor quality leaves especially deficient in protein, which is one of the most essential nutrients for silkworms as the leaf protein is converted into silk protein (sericin and fibroin) through biological process in silkworm (Fukuda *et al.*, 1959; Takeuchi, 1960).

### **SPRAY VOLUME AND RESIDUAL TOXICITY ON SILKWORM**

The spray volume required for blight diseases of mulberry are classified into three groups such as high volume (HV), low volume (LV) and ultra low volume (ULV). The required solution of fungicide per hectare for spraying on the foliage in respect to HV, LV and ULV ranges from 450-600 litres, 250-400 litres and 5 litres, respectively. The HV technique can be used when the disease is very severe in mulberry gardens (more than 50 %), while LV can be adopted in fields moderately affected (less than 50 %) by the disease. However, for prophylactic/preventive measure, the ULV technique can be followed (Sharma - unpublished). After spraying of fungicides, the residual effect on silkworms is the main concern as silkworms are very sensitive to chemicals. The bioassay study of sprayed fungicide should be conducted before using the mulberry leaves for silkworm rearing. The recommended fungicides used for the control of blight diseases in mulberry do not have residual toxicity for longer duration and sprayed leaves can safely be used for silkworm rearing after one week of foliar spraying. If a new fungicide is being tested/tried and safe period is not known in such case, the tentative safe period could be found out by observing the different coloured triangular marks on fungicide pack such as red/yellow, blue and green where the safe period to be followed as 15-20, 5-7 and 3-5 days, respectively.

### **STRATEGIES FOR TACKLING BLIGHT DISEASES**

To achieve the desired level of control measures, knowledge on correct and accurate diagnosis of the disease is required. This criterion can save the plant from the disease by adoption of suitable control measures. All over the world, the most common and effective method for the control of blight diseases in mulberry is chemical fungicides. The approaches of biological control and botanicals are mostly effective in the laboratory and in the green house conditions but these approaches are less successful in the field especially when the intensity of disease is very high. Therefore, it is necessary to develop an integrated disease management strategy by combining all the possible components like judicious application of fungicides (sub-lethal dose), effective botanicals and biocontrol agents for the control of blight diseases in mulberry. Further, there is a need to study different isolates of blight pathogens and host pathogen interaction for developing effective disease management strategies. Molecular approaches like RFLP, RAPD and axenic/cell culture techniques can be employed to understand the host pathogen interaction at molecular level, so as to develop appropriate methods for tackling the blight pathogens. Research on development of disease forewarning/forecasting models suited for different agro climatic zones needs special emphasis for integrated disease management programme.

## REFERENCES

- AKTHAR M. A. & SARWAR M. (1988) Mulberry bacterial blight in Pakistan. *Pak J. Agric. Res.*, 9, 417-419.
- ALI R. & AHMED S. U. (1987) New record of mulberry wilt in Bangladesh. *Bangladesh J. Botany*, 16, 207-208.
- AMANI B. & AKHAVIZADEGAN M. (1979) Occurrence of bacterial blight of mulberry in Iran. *Iran J. Plant Pathol.*, 15, 62-76.
- CHANTURIYA, N. N. & L. V. LABAKHUA (1963) Listing of antibiotics to control bacterial infection in mulberry trees. *Soobsh Akad Nauk Gruz SSR*, 32, 141-148.
- CHOWDARY N. B., SHARMA D. D., NISHITHA V. N. & MALA V. R. (2005) Occurrence of *Cladosporium chlorocephalum* causing stem blight in Mulberry. In: *Advances in Tropical Sericulture*. Dandin, S. B.; Misra, R. K.; Gupta V. P. & Reddy Y. S. (eds) National Academy of Sericultural Sciences, India. Bangalore, pp. 172-174.
- DANDIN S. B. (ed.), Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, pp. 52.
- CHRISTOFF A. (1930) Some plant diseases new to Bulgaria. *Renseignements Agricola Sofia*, 11, 18.
- COTEANCE O. (1971) Diseases of mulberry their prevention and control. *Sericultura*, 7, 22-29.
- DAYAKAR YADAV B. R. & SUKUMAR J. (1987) Occurrence of a new stem blight and collar-rot disease of mulberry from India. *Sericologia*, 27, 205-206.
- DOIDGE E. M. (1915) The South African mulberry blight *Bacterium mori* (Boyer et Lambert) Smith. *Ann. App. Biol.*, 2, 113-124.
- DOWSON W. J. (1932) Notes on some bacterial plant diseases in Tasmania. *J. Pomo. Horti. Sci.*, 10, 301-305.
- DOWSON W. J. (1957) Plant diseases due to bacteria (2nd ed). Syndicis of Cambridge University Press, Cambridge.
- ERTIAN H. (2003) Protection of Mulberry Plants (Translated from Chinese). Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India.
- FERNANDES A. M. M. (1999) *Pseudomonas syringae* pv. *mori* : causal agent of a bacterial disease of mulberry (*Morus* sp.)- In: Biennial Meeting (2nd) of the Portuguese Phytopathology Society, Portugal, pp. 61-66.
- FUKUDA T., SUDA M., MATSUDA M., MAYASHI T., KOUROSO T., HORIUSHI Y. & FLORRIN M. (1959) Formation of the silk protein during the growth of the silkworm. *Biochem.*, 12, 90-112.
- FUKUCHI Y. & MITSUEDA T. (1982) Relation between interaction period and occurrence of dogare blight caused by *Diaporthe noumrai* Hara (mulberry trees). *Tohoku Agricultural Research*, 31, 299-300.
- GANGWAR S. K. & THANGAVELU K. (1991) Occurrence of mulberry diseases in Tamil Nadu. *Indian Phytopathol.*, 44, 545-549.
- GANGAWAR S. K. & THANGAVELU K. (1995) Varietal and seasonal incidence of bacterial leaf blight disease of mulberry caused by *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens. *Indian J. Seric.*, 34, 110-113.
- GOVINDAIAH, SHARMA D. D., SINGHAL B. K. & SENGUPTA K. (1990) *Fusarium pallidorozeum* (Cook) Sacc. - A new pathogen causing leaf blight in mulberry (*Morus alba* L.). *Indian J. Seric.*, 29, 291-292.
- GOVINDAIAH & SHARMA D. D. (1993) Report on advance training on management of mulberry disease and pests (Zhejiang Agric. Univ., Hangzhou, China). Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India.
- GOVINDAIAH & SHARMA D. D. (2001) Importance of cultural practices in management of mulberry diseases. *Indian Silk*, 40, 5-6.
- GUNASEKHAR V., GOVINDAIAH & DATTA R. K. (1992) A new leaf blight of mulberry (*Morus* sp.) caused by *Alternaria alternata* in India. *Indian J. Seric.*, 31, 131-134.

- GUNASEKHAR V., PHILIP T., GOVINDAIAH, SHARMA D. D., NAGARAJ B. & DATTA R. K. (1994a) Seasonal occurrence of foliar fungal and bacterial diseases of mulberry in South India. *Indian Phytopathol.*, 47, 72-76.
- GUNASEKHAR V., GOVINDAIAH & DATTA R. K. (1994b) Occurrence of *Alternaria* leaf blight of mulberry and a key for disease assessment. *Int. J. Trop. Plant Dis.*, 12, 53-57.
- GUPTA V. P., TIWARY S. K. & DATTA R. K. (1995) Surface ultrastructural studies on ingress and establishment of *Pseudomonas syringae* pv. *mori* on mulberry leaves. *J. Phytopathol.*, 50, 415-418.
- GUPTA V. P., GOVINDAIAH & RAJU H. V. (1997) Diseases and associated fungal pathogens of mulberry nurseries. *Indian Phytopathol.*, 50, 402-407.
- GUPTA V. P., RAJU H. V., KUMAR V. & GOVINDAIAH (1998) Surface ultrastructure of infection process of *Alternaria alternata* and *Fusarium pallidoroseum* on mulberry. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz*, 31, 429-434.
- GUPTA V. P. & SARKAR A. (1999) Management of diseases in mulberry nurseries for better sapling survivability and growth. *Indian Farming*, 49, 15-16.
- GUPTA V. P., KUMAR V., MISHRA R. K., SHARMA D. D., SARKAR A. & THIAGARAJAN V. (2001) Mulberry shoot blight: Axenic culture, pathogenicity and plant-pathogen interaction. *Archiv fur Phytopathologie und Pflanzenschutz*, 34, 399-406.
- GUPTA V. P. (2001) Disease of mulberry and their management; In *Plant Pathology*. Trivedi, P. C. (ed), Pointer publisher, Jaipur, India, pp. 130-164.
- GVINEPADZE M. S. H., KHURTSIYA B. N., SHUTASISHVILI N. A. & TUKHARELI A. R. (1978) Comparative toxicity of new fungicides with respect to causal agent of bacteriosis of mulberry *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens. *Soobsch. Akad. Nauk. Gurzi. SSR.*, 92, 713 - 716.
- HORI S. (1906) Black blight of mulberry a bacterial disease. *Dainiponsanshikaiho.*, 164, 9-12.
- KORE S. S., PATIL P. S. (1985) Investigations on bacterial blight disease of mulberry (*Morus alba* L.). *Indian Phytopathol.*, 38, 622.
- KRISHNA PRASAD K. S. & SIDDARAMAIAH A. L. (1978) Studies on the bacterial leaf blight of mulberry in Karnataka. *Indian J. Seric.*, 17, 61-63.
- KUBOMURA Y. & NAKAYAMA K. (1975) On the overwintering of the causal pathogen of a bacterial blight of mulberry *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Steven in dead leaves of the mulberry. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 44: 287-293.
- LATHA J., PHILIP T., SHARMA D. D., CHANDRASHEKAR D. S. & GOVINDAIAH (2000) A new leaf blight disease on mulberry, caused by *Helminthosporium tetramera* McKinney. *Indian J. Seric.*, 39, 172-173.
- MAJI M. D., QADRI S. M. H. & PAL S. C. (1998) *Xanthomonas campestris* pv. *mori* - a new bacterial pathogen of mulberry. *Sericologia*, 38, 519-522.
- MAJI M. D. & QADRI S. M. H. (1999) Bacterial diseases of mulberry (*Morus* spp). *Sericologia*, 39, 1-7.
- MATSUO T. (1952) Pathological studies of the bud blight of mulberry tree I. On the occurrence and development of the disease. *J. Fac. Text and Seric. Shinshu Univ. Ser. Applied Biol.*, 2, 1-14.
- MATSUO T. (1953) Pathological studies of the bud blight of mulberry tree - on the influence of manure upon the development of the disease and the formation of sporodochia and perithecia of the casual fungus. *J. Fac. Text and Seric. Shinshu Univ. Ser. Applied Biol.*, 2, 1-14.
- MATUO T. (1958) Pathological studies of the bud blight of mulberry trees - physiological characters of the causal fungus *Gibberella lateritium*. *J. Fac. Text & Seric. Shinshu Ser. Applied Biol.*, 8, 17-42.
- MINAMIZAWA K. (1997) *Moriculture- Science of Mulberry cultivation* (Translated from Japanese). Oxford and IBH Publishing co. Pvt. Ltd., New Delhi, India, pp.139-164.
- MISRA A. K., DAS B. K. & AHSAN M. M. (1994) Stem blight of mulberry. *Indian Phytopathol.*, 47, 111-112.
- NAGARAJ M. S., SRINIVASACHARY & KHAN A. N. A. (2000) Growth requirements of *Xanthomonas campestris* pv. *moricola* causing bacterial blight of mulberry. In: *National Seminar*

- on Tropical Sericulture. CHINNAASWAMY K. P., GOVINDAN R., KRISHNAPRASAD N. K., REDDY D. N. R. (eds.), University of Agricultural Sciences, G.K.V.K, Bangalore, India, pp. 124-126.
- NAGARAJ M. S. (1997) Ecology and transmission of bacterial blight of mulberry (*Morus alba* L.). M. Sc., Agric., Thesis, University of Agricultural Sciences, G.K.V.K, Bangalore, India.
- NOVAK J. B. & LANZOVA J. (1983) Bacteriosis of mulberry in Czechoslovakia. Sbornik UVIZ Ochraňa Rostlin, 19, 5-9.
- PATHAN I. M. (1987) Research and Survey Reports, Pakistan. Quarterly News Letter, APPC, FAO, Thailand, 30, 33-34.
- PHILIP T., GUPTA V. P., GOVINDAIAH, BAJPAI A. K. & DATTA R. K. (1994) Diseases of mulberry in India -Research priorities and management strategies. Int. J. Trop. Plant Dis. 12, 1-21.
- PHILIP T., GOVINDAIAH, BAJPAI A. K., NAGABHUSHANAM G. & NAIDU N. R. (1997) A preliminary survey on mulberry diseases in South India. Indian J. Seric., 36, 128-132.
- QADRI S.M.H., PRATHEESH KUMAR P. M., GANGWAR S. K., ELANGO VAN C., MAJI M. D. & SARATCHANDRA B. (1998) Crop loss assessment due to powdery mildew in mulberry. Bull. Sericult., 9, 31-35.
- QADRI S.M.H., GANGWAR S. K., PRATHEESH KUMAR P. M., ELANGO VAN C., DAS N. K., MAJI M. D. & SARATCHANDRA B. (1999) Assessment of cocoon crop loss due to leaf spot disease of mulberry. Indian J. Seric., 38, 35-39.
- RAJU H. V. (1998) Investigations on fungal leaf blight diseases of mulberry (*Morus alba* L.). Ph. D. Thesis, University of Mysore, Mysore, India.
- RAO Y. R. M., KODANDARAM M. S. & SRINIVASAN E. B. (1981) Effect of leaf spot disease on the composition (food contents) of mulberry (*Morus alba* L.) leaves. J. Mysore Univ., India, 28, 21-23.
- RAVIKUMAR M. R., PRAKASH B.G. & SHAMARAO J. (2004) Report of bacterial blight in mulberry from Northern Karnataka and its management. Sericologia, 44, 381-383.
- SAITO H., YAMADA N., NAICHINISHI H. & MATUO T. (1978) Chlamydospore formation of *Fusarium lateritium* f. sp. *mori* and *F. solani* f. sp. *mori* in soil extract and detection of both fungi and other fusaria from the soil of *Fusarium* blight occurring mulberry fields. J. Seric. Sci. Jpn., 47, 193-200.
- SASTRY C. R. (1984) Mulberry varieties, exploitation and pathology. Sericologia, 24, 333-359.
- SATO M., & TAKAHASHI K. (1972) Ecological studies on the bacterial blight of mulberry- the over wintering of the pathogen, *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens. J. Seric. Sci. Jpn., 41, 285-293.
- SATO M., TAKAHASHI K. & WAKIMOTO S. (1971) Properties of the causal bacterium of bacterial blight of mulberry, *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens and its phages. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 37, 128-135.
- SATO M. & TAKAHASHI K. (1973) Rough colony mutant of *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn., 39, 425-428.
- SATO M., TAKAHASHI K., UEMATSU T. & OHATA K. (1981) Selective media for isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *mori* the pathogen of bacterial blight in mulberry. J. Seric. Sci. Jpn., 50, 409-414.
- SAHIN F., KATAN R. & DONMEZ M. F. (1999) First report of bacterial blight of mulberries caused by *Pseudomonas syringae* pv. *mori* in the Eastern Anatolia Region of Turkey. Plant Disease, 83, 1176.
- SENGUPTA K, KUMAR P., BAIG M. & GOVINDAIAH (1990) Hand book on Pest and Disease Control of Mulberry and Silkworm. United Nations, Economic and Social Commission for Asia and Pacific, Bangkok, Thailand, pp. 3-15.
- SHARMA D. D. & GOVINDAIAH (1991) Comparative *in vitro* toxicity of fungicides against *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens causing bacterial blight of mulberry. Indian J. Seric., 30, 139-140.

- SHARMA D. D., GOVINDAIAH, MISHRA R. K., CHOUDHARY P. C., BAJPAI A. K. & DATTA R. K. (1993) Influence of various agronomical practices and input on the incidence of mulberry diseases in chawki garden. *Indian J. Seric.*, 32, 150-155.
- SHARMA D. D., GOVINDAIAH, DAS P. K., PHILIP T., CHOUDHARY P. C. & DATTA R. K. (1994) Influence of bacterial biofertilizers under graded levels of nitrogen on the incidence of major mulberry diseases. *Indian J. Seric.*, 33, 31-35.
- SHARMA D. D., GOVINDAIAH, KATIYAR R. S., DAS P. K., JANARDHAN L., BAJPAI A. K. & CHOUDHARY P. C. (1995) Effect of mycorrhizal fungi on the incidence of various mulberry diseases. *Indian J. Seric.*, 34, 34-37.
- SHARMA D. D., GOVINDAIAH, GHOSH A., PHILIP T., AMBIKA P. K. & CHOUDHARY P. C. (1996) Effect of seasons, spacings, host genotypes and fertilizers doses on the incidence of major foliar diseases of mulberry. *Indian J. Seric.*, 35, 57-61.
- SHARMA D. D., BAQUAL M. F., GUPTA V. P. & CHANDRASHEKAR D. S. (2000) A survey on the occurrence of bacterial blight disease complex in mulberry. *Indian J. Seric.*, 39, 113-116.
- SHARMA D. D., BAQUAL M. F., GUPTA V. P. & CHANDRASHEKAR, D. S. (2001). Efficacy of plant extracts against *Pseudomonas syringae* pv. *mori* and *Xanthomonas campestris* pv. *mori* causing bacterial blight in mulberry. *Indian J. Seric.*, 40, 109-111.
- SHIRATA A., SITOI K., TAKAHASHI K. & TISHIE S. (1980) Effect of temperature on fungal growth and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from mulberry twig blight and tolerance of the isolates to antifungal substances originating from mulberry shoots. *Bull. Seric. Expt. Stn. Jpn.*, 27, 808-830.
- SIDDARAMAIAH A. L. & HEGDE R. K. (1988) A New root rot, bud and leaf blight of mulberry seedlings from India. *Indian J. Seric.*, 27, 161.
- SIDDARAMAIAH A. L. & HEGDE R. K. (1990) Studies on changes in biochemical constituents of *Cercospora* infected leaves of mulberry. *Mysore J. Agric. Sci.*, 24, 353-357.
- SINHA S. K. & SAXENA S. F. (1966) First record of bacterial blight of mulberry in India caused by *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens. *Indian Phytopathol.*, 19, 318-319.
- SRIKANTASWAMY K., RAVEESHA K. A., GUPTA V. P., REKHA M. & SIKDAR A. K. (2000) Epidemiology and disease development of *Fusarium* leaf blight in mulberry. In: National Conference on Strategies for Sericulture Research and Development. DATTA R.K. (ed.), Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, pp. 54.
- SUKUMAR J. & PADMA S. D. (1999) Diseases of mulberry in India - Research progress and priorities. In: Advances in mulberry sericulture. DEVAIAH M. C., NARAYANASWAMY K. C., MARIBASHETTY V. G. (eds.), C. V. G. Publications, Bangalore, India, pp. 152-186.
- SUKUMAR J. & YADAV B. R. D. (1988) Occurrence of a bud blight disease of mulberry caused by *Fusarium lateritium* f. sp. *mori* type-A in India - a new report. *Current Sci.*, 57, 49-50.
- TAKAHASHI K. (1975) Mulberry diseases and its control. *Japan Pesticide Information*, 25, 27-31.
- TAKAHASHI K. (1980) The causal pathogen of bacterial blight of mulberry and its control. *JARQ*, 14, 41-45.
- TAKAHASHI K. & SATO M. (1977) A new strain of *Pseudomonas mori* causing halo blight of mulberry. *Annals Phytopathological Society Jpn*, 43, 593-597.
- TAKEUCHI Y. (1960) Ability of silkworm (*Bombyx mori* L.) to recover from malnutrition. *The Silk News Letter*, 5: 6-7.
- TEOTIA R. S. & SEN S. K. (1994) Mulberry diseases in India and their control - a preview. *Sericologia*, 34, 1-19.
- TEOTIA R. S. & MANDAL S. K. (1993) Bacterial leaf blight disease of mulberry. *Indian Silk*, 32, 41-44.
- TOURKOGLU K. & OKTEM Y. E. (1973) Studies on the symptomatology and biochemical characteristics of bacterial mulberry blight caused by *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Stevens. *Bitki Koruma Bul.*, 13, 19-29.
- ZING Z. T., FANG T. Y., XION H. G., HUAIZHONG F. & BEN M. (1988) Mulberry cultivation. *Agricultural Service Bulletin*, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.

## LES MALADIES DE LA FLÉTRISSURE DU MURIER (*MORUS* SPP.)

D. D. SHARMA, N. B. CHOWDARY, V. NISHITA NAIK, MALA V. R. & S. B. DANDIN

Central Sericultural Research & Training Institute, Srirampura, Mysore – 570 008, Inde.

*Le mûrier (*Morus* spp.) est un arbre pérenne cultivé pour son feuillage pour élever le ver à soie (*Bombyx mori* L.). La culture est affectée par de nombreuses maladies foliaires, parmi lesquelles plusieurs maladies de la flétrissure provoquées par différents pathogènes, qui sont les maladies les plus sévères et entraînent une perte de rendement foliaire jusqu'à 15 % tout en détériorant la qualité de la feuille. Les symptômes de la flétrissure se manifestent sur différentes parties des plantes, la feuille, la tige, la pousse, le bourgeon, etc.. On a rapporté un certain nombre de maladies de la flétrissure chez le mûrier telles que la flétrissure de la feuille *Alternaria*, la flétrissure de la feuille *Fusarium*, la flétrissure de la feuille *Helminthosporium*, la flétrissure de la feuille *Colletotrichum*, les flétrissures *Sclerotium*, la flétrissure du bourgeon, la flétrissure du rameau, la flétrissure de la branche, la flétrissure de l'enroulement de la feuille, la flétrissure bactérienne de la feuille ainsi que d'autres flétrissures provoquées par différents pathogènes fongiques et bactériens dans différentes parties du globe. Des mesures de lutte adaptées et opportunes sont nécessaires pour éviter les pertes de rendement foliaire sur le plan quantitatif et qualitatif provoquées par les maladies de la flétrissure. Compte tenu de cela, nous passons en revue dans cet article divers aspects liés à la maladie de la flétrissure c'est à dire la symptomatologie, l'épidémiologie, le cycle de la maladie et les mesures de lutte.*

### INTRODUCTION

Les maladies sont l'un des principaux facteurs limitatifs pour la culture réussie de nombreuses cultures dont le mûrier (*Morus* spp.). Le mûrier est une plante pérenne cultivée sous forme de buissons ou d'arbres pour son feuillage pour élever les vers à soie dans les pays tropicaux et sub-tropicaux. La culture est sensible à de nombreuses maladies provoquées par des champignons, des bactéries, des virus, des organismes semblables à des mycoplasmes, des nématodes, etc.. Ces maladies sont soit de nature aérienne (maladies foliaires) ou souterraine (maladies de la racine), et diminuent le rendement foliaire de l'ordre de 20 % tout en détériorant la qualité. Les principales maladies qui affectent le feuillage sont la tache de la feuille, le mildiou poudreux, la rouille et la flétrissure de la feuille. Les études réalisées par divers auteurs ont révélé que les maladies de la flétrissure sont répandues pendant toute l'année dans tous les pays où l'on pratique la sériciculture, ce qui entraîne d'importantes pertes de rendement foliaire à la fois avec les systèmes sans irrigation et avec irrigation (Teotia et Sen, 1994 ; Gunasekhar et coll., 1994a ; Philip et coll., 1994 ; 1997 ; Minamizawa, 1997 ; Maji et Qadri, 1999 ; Ertian, 2003). La flétrissure apparaît sous la forme d'un brunissement / d'un noircissement / d'une brûlure des différentes parties des plantes comme la feuille, la tige et le bourgeon. On a rapporté que les champignons et les bactéries provoquent des maladies variées de la flétrissure chez le mûrier. D'après les symptômes qui apparaissent sur diverses parties de la plante, on appelle les maladies de la flétrissure, flétrissure de la feuille, flétrissure de la tige, flétrissure du rameau, flétrissure du tronc, flétrissure de la pousse, flétrissure du bourgeon, etc. L'incidence de la flétrissure est plus sévère quand on cultive les plants avec un système d'espacement resserré et a un effet sur la valeur nutritionnelle

de la feuille en diminuant l'humidité, les protéines, la teneur en chlorophylle et en sucres. L'alimentation des vers à soie avec des feuilles infestées, déséquilibrées sur le plan nutritionnel a un effet adverse sur le rendement et les caractères commerciaux du cocon (Rao et coll., 1981 ; Sastry, 1984 ; Siddaramaiah et Hegde, 1990 ; Raju, 1998). Cette revue présente les recherches réalisées jusqu'à présent sur différentes maladies de la flétrissure du mûrier et nous avons également identifié les voies prioritaires pour les recherches futures car il reste beaucoup de travail à faire pour lutter contre les maladies de la flétrissure.

## FLETRISSION FONGIQUE DE LA FEUILLE

La flétrissure fongique de la feuille provoquée par des espèces variées d'*Alternaria*, de *Fusarium*, d'*Helminthosporium* et de *Colletotrichum* est principalement répandue dans les régions tropicales. La flétrissure de la feuille provoquée par les espèces d'*Alternaria* et de *Fusarium* est la plus répandue en Inde, en Chine et au Japon (Philip et coll., 1994 ; Minamizawa, 1997 ; Gupta, 2001 ; Ertian, 2003) tandis que la flétrissure provoquée par les espèces *Colletotrichum* et *Helminthosporium* est courante en Inde (Gupta et coll., 1997 ; Latha et coll., 2000). Ces flétrissures fongiques de la feuille entraînent une perte en rendement foliaire de l'ordre de 10 % et la détérioration de la qualité de la feuille. D'après les pathogènes fongiques, on classe les flétrissures de la feuille comme suit.

### (i) Flétrissure de la feuille *Alternaria* :

Gunasekhar et coll., (1994b) ont rapporté pour la première fois la présence de la flétrissure de la feuille en Inde provoquée par *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler appartenant à la famille Dematiaceae, de l'ordre des Moniliales de la classe des Deuteromycetes. Bien que la maladie domine dans la péninsule indienne pendant toute l'année, la sévérité de la maladie est plus remarquable en été. La température de 25-30° C et l'humidité relative de 40-60 % sont propices à l'éruption des flétrissures fongiques (Raju, 1998). La maladie est caractérisée par le dessèchement (noircissement / brunissement) des feuilles qui commence par l'extrémité de la feuille et s'étend à la base, en recouvrant complètement le limbe foliaire, puis le pétiole. Alors que la maladie progresse, les feuilles très affectées flétrissent et tombent. L'inoculum est principalement aérien et s'étend grâce aux conidies, qui infestent les feuilles en provoquant la détérioration des tissus qui entraîne des symptômes de la flétrissure. Les conidiophores et les conidies du champignon sont de couleur jaune-marron. Les conidies sont étroites, ovoïdes à ellipsoïdales, mesurant 8-12 × 26-27 µm, avec 3 à 8 septes transversales et 1 à 3 septes longitudinaux. Les conidies germent en produisant plus d'un tube germinatif, qui se termine en projections ressemblant à des doigts appelés appressoria. Ces appressoria aident le pathogène à entrer dans le tissu foliaire par pénétration directe par la cuticule de la feuille et l'épiderme ou par les blessures (Gupta et coll., 1998). *Alternaria* reste dormante dans les feuilles infestées et survit dans le sol sur les débris des plantes en infestant la nouvelle culture quand les conditions sont propices. Parmi les différents fongicides utilisés pour lutter contre la flétrissure *Alternaria*, on constate que la vaporisation foliaire de Dithane M-45 à 0,2 % (mancozeb 75 %) est efficace contre la maladie. Les agents biologiques comme *Trichoderma harzianum*, *T. pseudokoningii* et *Gliocladium virens* inhibent la croissance mycéliale d'*A. alternata* jusqu'à 75 % dans des conditions *in vitro* (Raju, 1998).

### (ii) Flétrissure de la feuille *Fusarium* :

Des espèces variées de *Fusarium* appartenant à l'ordre des Moniliales de la classe des Deuteromycetes entraînent la flétrissure de la feuille chez le mûrier. Le stade parfait de ce champignon est *Gibberella baccata* (Ces. et De Not.) Sacc. var. *moricola* classe des Ascomycetes. Cependant, en Inde, on rapporte que *F. pallidoroseum* (Cooke) Sacc., *F. lateritium* Nees. F. sp. *mori* (Desm.) Matuo et Sato, *F. moniliforme* Sheldon var. *intermedium* Neish et Lagget et *F. solani* (Mart.) Sacc entraînent la flétrissure de la feuille chez les plantules de mûrier et les plants établis (Sukumar et Padma, 1999).

*F. lateritium* f. sp. *mori*, *F. oxysporum* Schlecht et *F. solani* entraînent aussi la flétrissure de la feuille du mûrier dans d'autres pays séricicoles (Saito et coll., 1978 ; Ali et Ahmed, 1987 ; Govindaiah et coll., 1990 ; Gupta, 2001 ; Ertian, 2003). Parmi eux, la flétrissure de la feuille provoquée par *F. pallidoroseum* et *F. lateritium* f. sp. *mori* est la plus courante. On observe la maladie dans toute l'Inde et au Japon pendant les saisons d'été et des pluies (Saito et coll., 1978 ; Raju, 1998). Srikantaswamy et coll., (2000) ont rapporté que la flétrissure de la feuille provoquée par des espèces variées de *Fusarium* est directement liée à l'âge de la culture et on observe l'indice maximum de la maladie à la période de la récolte foliaire (70 jours après la taille).

La température, l'humidité relative et l'âge de la culture sont corrélés positivement et contribuent de manière significative au développement de la maladie. Les symptômes de la flétrissure de la feuille *Fusarium* apparaissent d'abord comme un brunissement ou un noircissement marginal des feuilles à partir du bord du limbe, qui plus tard se répand vers la nervure médiane, et entraînent la défoliation. Les hyphes fongiques engendrent de simples conidiophores, qui produisent deux types de conidies les micro et les macro. Les micro conidies n'ont qu'une cellule de forme ovoïde / oblongue. Les macro-conidies sont hyalines, allongées, filiformes et multiseptées avec des extrémités pointues mesurant  $14,3 \times 5,02 \mu\text{m}$ . Chaque macro-conidie engendre plusieurs tubes germinatifs, qui croissent et pénètrent la feuille de mûrier directement par les stomates sans développer d'appressoria ni d'autre structure de pénétration spécialisée (Gupta et coll., 1998). Le pathogène est présent dans l'air et dans le sol et survit dans les débris de culture sous la forme de chlamydospores. On utilise des fongicides variés pour lutter contre la flétrissure *Fusarium*. La vaporisation foliaire de Dithane M-45 à 0,2 % s'avère efficace contre la maladie. Les agents biologiques comme *Trichoderma harzianum*, *T. pseudokoningii* et *Glilotadium virens* inhibent la croissance mycéliale de *F. pallidoroseum* jusqu'à 80 % dans des conditions *in vitro* (Raju, 1998).

### iii) Flétrissure de la feuille *Colletotrichum* :

On a rapporté l'infestation sévère des jeunes plants par *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig et Sacc. dans les pépinières en Inde (Gupta et coll., 1997 ; Gupta, 2001). Le champignon appartient à la classe des Deuteromycetes.

La maladie apparaît comme un noircissement ou une brûlure des feuilles des jeunes plants qui affectent leur croissance. Les feuilles jeunes / tendres des jeunes plants de mûrier de 2 à 3 mois sont très sensibles et dans des conditions sévères, les jeunes plants meurent. Le pathogène survit sur les tissus morts de l'hôte dans le sol, qui servent de source primaire de l'inoculum (Gupta et Sarkar, 1999). La maladie se répand sur le terrain par le sol contaminé, l'eau d'irrigation, les outils de culture et par le vent. Le champignon produit des conidies sur des conidiophores. Les conidies sont ovoïdes / oblongues, hyalines et unicellulaires et mesurent  $12,2$  à  $15,9 \mu\text{m}$  (moyenne  $14,2$ )  $\times$   $2,8$ - $3,75 \mu\text{m}$  (moyenne  $3,5$ ). Le pathogène hiberne sous la forme d'acervules et de mycelium dans les feuilles infestées et dans le sol. Dans des conditions favorables, les conidies germent et infestent les jeunes plants. On pourrait empêcher l'infestation en retirant et en brûlant les feuilles / les branches malades. De plus, avant la plantation des boutures dans les pépinières, il est recommandé de les tremper dans une solution à 0,1 % de mancozeb 75 % WP pendant 30 minutes pour éviter que la maladie ne se répande (Gupta et Sarkar, 1999).

### (iv) Flétrissure de la feuille *Helminthosporium* :

La maladie est provoquée par *Helminthosporium tetramera* McKinney appartenant à la classe des Deuteromycetes et on l'observe en Inde (Latha et coll., 2000). On remarque l'intensité de la maladie pendant la saison des pluies et la perte de rendement foliaire est de l'ordre de 6 %. La maladie est favorisée par une humidité relative modérée (plus de 50 %) et une température de 20 à 30° C. Les symptômes sont la flétrissure et le dessèchement. Les parties desséchées deviennent de couleur cendre. La flétrissure s'étend irrégulièrement sur toute la feuille entourée par un bord fin de couleur marron clair. Les éclaboussures de pluie, le vent et les insectes disséminent le pathogène. Le

champignon hiberne dans les débris de culture sous la forme de chlamydospores. Il produit des conidies sur les conidiophores. Chaque conidie produit plus d'un tube germinatif, qui pénètre la feuille de mûrier par les stomates ou l'épiderme rompu. Jusqu'à présent, on n'a pas rapporté de mesures de lutte.

**v) Flétrissure *sclerotium* :**

On rapporte les flétrissures *sclerotium* en Chine (Ertian, 2003).

Les pathogènes ont un effet sur les fruits du mûrier. La maladie se produit pendant toutes les saisons et on peut la classer en trois types c'est à dire, le *sclerotium* gras [*Ciboria shiraiana* (Henn) Wketzell], le petit *sclerotium* [*Ciboria carunculoides* (Sieglér et Jenkins) Whetzel et Wolf] et le *sclerotium* fin [*Mitrella shiraiana* (Henn.) Ito et Imai]. Les trois pathogènes appartiennent à l'ordre des Helotiales de la classe des Ascomycetes. Le *sclerotium* gras est caractérisé par le gonflement et la décoloration des fruits du mûrier et par l'émission d'une odeur alcoolisée par les fruits malades. Avec le petit *sclerotium*, les fruits deviennent petits et gras. Tandis qu'avec le *sclerotium* fin, les fruits rétrécissent, durcissent et tombent. Tous les pathogènes hibernent sous la forme d'apothecium chez les fruits malades. L'apothecium est en forme de coupe et a plusieurs asques. Chaque asque a 8 ascospores, qui sont de forme ovale et sans couleur. L'ascospore germe et répand la maladie. On peut lutter contre ces maladies en vaporisant 0,1 % de méthyl thiophinate à 70 % WP, du vinyle thiophate à 0,1 % à 50 % WP ou du carbendaxol 50 % WP à 0,1 % (Govindaiah et Sharma, 1993 ; Ertian, 2003).

**vi) Flétrissure du bourgeon :**

La flétrissure du bourgeon provoquée par des espèces variées de *Fusarium* est courante en Inde, en Chine et au Japon.

La maladie apparaît au stade de plantule / de jeune plant et dans les plantations établies après la récolte / la taille du plant. Au stade de jeune plant, la flétrissure du bourgeon est provoquée par *F. solani* (Mart.) Sacc. Les symptômes apparaissent sur le jeune bourgeon sous la forme de petites taches gorgées d'eau, qui deviennent de couleur marron noire et entraînent la flétrissure / le brunissement des bourgeons en croissance (Siddaramaiah et Hegde, 1988).

En Chine, au Japon et en Inde, le brunissement du bourgeon dans les cultures établies est provoquée par *F. lateritium* var. *mori* (Nees) Desm. pendant les saisons du printemps et de l'hiver (Matsuo, 1952, 1953 ; Matsuo, 1958 ; Shirata et coll., 1980 ; Sukumar et Yadav, 1988 ; Govindaiah et Sharma, 1993 ; Ertian, 2003). On reconnaît la maladie par l'apparition de taches marron noir huileuses près du bourgeon. Ces taches s'agrandissent, les tissus pourrissent et les jeunes pousses flétrissent. La zone nodale entourant les bourgeons se décolore et se nécrose. La zone nécrotique s'étend à la fois horizontalement et verticalement le long de la tige. Les parties très infestées du bourgeon se dessèchent. Le pathogène hiberne sous la forme de mycelium ou de conidies dans les branches malades. Il existe deux stades, le stade imparfait (stade asexué) et le stade parfait (stade sexué). *F. lateritium* var. *mori* est le stade imparfait tandis que *Gibberella baccata* var. *moricola* est le stade parfait. Le pathogène attaque le bourgeon sur les blessures provoquées par le vent, la pluie et les insectes. Une température de 22-30° C avec une humidité relative d'environ 75-85 % favorise l'éruption de la maladie. On peut minimiser la maladie par la plantation de cultivars résistants à la maladie comme Husang 5 et Tongxiangqin. De plus, on recommande la vaporisation foliaire de méthyl thiophanate (70 % WP), de sulfure de chaux et de Captan pour lutter contre la maladie (Minamizawa, 1997 ; Sukumar et Padma, 1999 ; Ertian, 2003).

**(vii) Flétrissure du rameau :**

La flétrissure du rameau est provoquée par *Hypomyces* (*Fusarium*) *solani* f. sp. *mori* / *Hypomyces solani* f. sp. *pist* (Jones) Snyder et Hans. Le stade parfait de ce champignon est *Gibberella baccata* var. *moricola*. La présence de la maladie est très courante en Chine et au Japon pendant les saisons d'hiver et du printemps. On rapporte une incidence de 38 à 46 % qui entraîne une diminution de la capacité

d'élevage jusqu'à 39 % (Minamizawa, 1997 ; Ertian, 2003). Les symptômes apparaissent en hiver et au printemps avec deux types de taches sur les rameaux de mûrier. Le premier type de taches est foncé et huileux avec les bourgeons d'hiver. Le deuxième type de taches est aqueux et ellipsoïde et de couleur marron et apparaît près des rameaux blessés. Les deux types s'étendent progressivement et forment de minuscules éruptions denses. On peut empêcher la maladie en enlevant les pousses affectées et en les détruisant en les brûlant et en vaporisant 0,05 à 0,1 % de Opzin M/Momiculin / Anles (Minamizawa, 1997). Ertian (2003) a rapporté qu'en plantant des variétés très résistantes telles que Tonguing black, le grand mûrier Pear leaf et Heigelu dans les zones sujettes à la maladie, cela peut considérablement minimiser la maladie.

#### (viii) Flétrissure de la branche :

La flétrissure de la branche est provoquée par *Fusicoccum mori* Yendo et est plus répandue en Chine pendant les saisons des pluies et après les pluies. Le champignon appartient à la classe des Deuteromycetes (Govindaiah et Sharma, 1993 ; Ertian, 2003). Généralement, les jeunes pousses sont affectées par le pathogène. Des taches marron noir apparaissent sur la tige 2 à 3 cm au-dessus du sol. Plus tard, l'épiderme de l'écorce pourrit et les plantes meurent. Le pathogène hiberne sous la forme de pycnides dans la branche malade. Le pathogène est un parasite faible qui se propage par les blessures et les lésions. Le mycélium croît de manière intercellulaire et forme des corps fructifères appelés pycnides contenant plusieurs pycnidiospores. Les pycnidiospores sont ovales à sphérique et mesurent  $20-30 \times 1-1,2 \mu\text{m}$ . Dans des conditions favorables, ces pycnidiospores germent et infestent la plante. Une température de 25-28° C et une HR de 85-90 % sont favorables pour le développement de la maladie. On peut lutter contre la maladie en enlevant les branches malades en hiver et en se débarrassant des taches au printemps. De plus, la vaporisation de carbendazime à 0,2 % (70 % WP) ou de Topsin (70 % WP) après la taille du printemps est efficace contre la maladie (Govindaiah et Sharma, 1993 ; 2003).

#### (ix) Flétrissure de l'enroulement de la feuille :

On appelle aussi la flétrissure de l'enroulement de la feuille maladie de la brûlure de la feuille et parfois maladie de la faible teneur en sucre. Elle est provoquée par *Hormodendrum mori* appartenant à l'ordre des Hypomycetales de la classe des Deuteromycetes. La maladie affecte en général les feuilles tendres et est plus courante pendant les saisons d'été, d'automne et du printemps en Chine. Pendant les saisons d'été et d'automne, les feuilles supérieures sont d'abord infestées par des brûlures sur le bord de la feuille et les feuilles brunissent et s'enroulent vers le haut. Les taches marron absorbent l'eau et se séparent sous les conditions de sécheresse. Au printemps, les bourgeons tombent à l'exception des bourgeons des extrémités. Le pathogène hiberne dans le sol sous la forme de mycélium. La maladie se propage par le vent et les gouttes de pluie. Le champignon produit des mycéliums qui produisent des conidiophores incolores. Une température d'environ 20 à 28° C avec 85 % d'humidité relative favorise le développement de la maladie. On peut lutter contre la maladie en vaporisant du carbendazim (70 % WP) ou du Topsin à 0,2 % (70 % WP) après la taille d'été (Govindaiah et Sharma, 1993 ; Ertian, 2003).

### FLETRISSURE BACTERIENNE DE LA FEUILLE

La maladie est provoquée par une bactérie, *Pseudomonas syringae* pv *mori* (Boyer et Lambert) Young appartenant à l'ordre des Pseudomonadales de la classe des Schizomycetes. *Bacterium mori* (Boyer et Lambert) et *Pseudomonas mori* (Boyer et Lambert) Steven sont synonymes de *P. syringae* pv. *mori* (Maji et Qadri, 1999). On a rapporté la première apparition de la flétrissure bactérienne au Japon (Hori, 1906). Plus tard, Doidge (1915) a rapporté la présence de la maladie en Afrique du sud, Christoff (1930) en Bulgarie, Dowson (1932) en Tasmanie, Sinha et Saxena (1966) en Inde, Ammanie et Akhazvizadegan (1979) en Iran, Novak et Lanzova (1983) en Tchécoslovaquie, Sing et coll., (1988)

en Chine, Akthar et Sarwar (1988) au Pakistan, Fernandes (1999) au Portugal et Sahin et coll., (1999) en Turquie. En Inde et au Japon, la maladie est connue en tant que flétrissure bactérienne tandis qu'en Chine elle est connue sous le nom de flétrissure noire / flétrissure du rétrécissement (Krishna Prasad et Siddaramaiah, 1978 ; Minamizawa, 1997 ; Ertian, 2003). De plus les espèces de *Xanthomonas* comme *X. campestris* pv. *mori* (Pommel) Dowson et *X. campestris* pv. *moricola* sont une autre série de pathogènes bactériens provoquant la flétrissure de la feuille du mûrier en Inde (Kore et Patil, 1985 ; Nagaraj, 1997 ; Maji et coll., 1998 ; Nagaraj, 1997 ; Maji et coll., 1998 ; Nagaraj et coll., 2000 ; Ravikumar et coll., 2004). Sharma et coll. (2000) ont observé que *P. syringae* pv. *mori* et *X. campestris* pv. *mori* s'avèrent être associés à la maladie de la flétrissure bactérienne provoquant l'ensemble de la maladie. Tous les types de flétrissure bactérienne sont plus courants pendant la saison des pluies suivis par la saison de l'hiver et on observe une perte de rendement foliaire d'environ 8 à 12 % chaque année ainsi qu'une détérioration de la qualité de la feuille. Une température atmosphérique fluctuant entre 20 à 30° C et une humidité élevée (plus de 80 %) sont favorables au développement de la maladie tandis que les précipitations et l'humidité relative sont en relation directe avec le développement de la maladie (Sato et Takahashi, 1973 ; Takahashi, 1980 ; Zing et coll., 1988 ; Sengupta et coll., 1990 ; Teotia et Mandal, 1993 ; Teotia et Sen, 1994 ; Gunakeshar et coll., 1994a ; Gangwar et Thangavelu, 1991 ; 1995 ; Sharma et coll., 2000). La maladie diminue considérablement la valeur nutritive des feuilles (Sato et Takahashi, 1973).

Les symptômes apparaissent comme de nombreuses petites taches irrégulières gorgées d'eau sur la surface inférieure des feuilles qui plus tard se répandent aussi sur la surface supérieure. Dans des conditions sévères, les taches grandissent et deviennent poly angulaires. Les nervures et les petites nervures deviennent nécrotiques. Finalement, les feuilles se recourbent, pourrissent et deviennent de couleur marron-noire. Les feuilles se froissent, se déforment et se courbent vers l'extérieur et tombent prématurément (Krishna Prasad et Siddaramaiah, 1978 ; Minamizawa, 1997 ; Ertian, 2003).

Les symptômes associés avec l'ensemble des maladies provoqué par *X. campestris* pv. *mori* et *P. syringae* pv. *mori* (population mélangée) sont caractérisés par l'apparition de nombreuses petites taches noir marron gorgées d'eau entourées par des bords auréolés sur la surface inférieure des feuilles qui plus tard se développent sur la surface supérieure (*X. campestris* pv. *mori*). Plus tard, de grandes pustules angulaires de couleur marron apparaissent, qui se fondent et forment de grandes zones nécrotiques irrégulières (*P. syringae* pv. *mori*). L'examen microscopique des tissus malades révèle le suintement d'une masse bactérienne blanc-jaune (Maji et coll., 1998 ; Sharma et coll., 2000).

Le sol est la première source d'infestation. L'infestation secondaire se produit par les pratiques d'irrigation et de culture. La bactérie est gram négative, en forme de crochet, motile, bipolaire monotriche / multitriche avec des flagelles mesurant 1,8 à 4,5 µm de longueur et 0,9 à 1,3 µm de largeur. Elle produit des colonies blanc-crèmeux, rondes et brillantes sur du milieu agar nutritif. Elle liquéfie la gélatine et rend le lait de tournesol alcalin. Elle n'est pas capable de produire des nitrites à partir des nitrates, ce qui montre une hydrolyse à l'amidon négative et l'utilisation du xylose (Sato et coll., 1971 ; 1981 ; Tourkoglu et Oktem, 1973 ; Takahashi, 1980 ; Maji et Qadri, 1999 ; Sharma et coll., 2000). *X. campestris* pv. *mori* produit des colonies de couleur jaune très mucilagineuses sur un milieu agar nutritif. Ces colonies sont convexes, brillantes et circulaires avec des bords entiers. La bactérie est gram négative, en forme de crochet avec un flagelle unique polaire, elle est présente seule ou en paires, est encapsulée et présente des réactions positives d'hydrolyse à l'amidon, à la gélatine, à la catalase et à la caséine et une réaction négative avec l'oxydase (Maji et coll., 1998 ; Sharma et coll., 2000). Le pathogène se propage par les stomates et les lésions provoquées par le vent, la pluie, les attaques d'insectes et la cystolithe (Govindaiah et Sharma, 1993 ; Gupta et coll., 1995). La bactérie hiberne pendant une durée plus longue dans les sols, les racines et les feuilles mortes (Sato et Takahashi, 1972 ; Kubomura et Nakayama, 1975). Après être entré dans le tissu foliaire, elle se multiplie et se répand de manière intercellulaire à un rythme rapide, ce qui cause des symptômes caractéristiques sur les plantes.

La taille des jeunes mûriers à l'automne suivie par la vaporisation de bouillie bordelaise est recommandée comme mesure de lutte contre la maladie de la flétrissure bactérienne (Dowson, 1957). Chanturia et Labakhua (1963) ont rapporté que la vaporisation de 0,05 à 0,1 % de phyto bacteriomyocine contenant 1 % de glycérine est plus efficace que la bouillie bordelaise pour lutter contre la maladie. Gvinepadze et coll., (1978) ont rapporté que le Benomyl et le Dithane M-45 sont très efficaces contre le pathogène. Les antibiotiques agricoles comme la Streptomycine, le mélange de cuivre - streptomycine (0,5 à 1 %) et les fongicides tels que le Benomyl ou le Dithane M-45 sont efficaces contre la flétrissure bactérienne (Takahashi, 1975 ; 1980 ; Krishna Prasad et Siddaramaiah, 1978 ; Sharma et Govindaiah, 1991). On a testé l'efficacité de divers produits à base de plantes dans des conditions *in vitro* contre *P. syringae* pv. *mori* et *X. campestris* pv. *mori*. Parmi eux, le Neem gold (Azadiractine à 0,15 % de CE) donne une zone d'inhibition jusqu'à 28,3 mm (Sharma et coll., 2001). En ce qui concerne la résistance de l'hôte à la maladie, les variétés comme Bulgarian-3, Bulgarian-24, Thileseuri et Galicene de Roumanie présentent une résistance à la flétrissure bactérienne (Coteance, 1971). Au Pakistan, on rapporte que les cultivars *M. indica* et *M. alba*, Husung, China, Shine ichinose, Gumji et Ichihie sont résistants à la fois dans des conditions en laboratoire et sur le terrain (Pathan, 1987 ; Akthar et Sarwar, 1988). Au Japon, on rapporte que les variétés de mûrier, Shimanouchi, Shinichinose, Minamisakari, Kenmochi et Roguwa sont très résistantes à la flétrissure bactérienne (Takahashi, 1980 ; Minamizawa, 1997). En Inde, on a trouvé que parmi les variétés indiennes, Berhampore local, MR-2, S-54 sont résistantes à la flétrissure bactérienne (Gangwar et Thangavelu, 1995 ; Sharma, non publié).

### MALADIES FONGIQUE/ BACTERIENNE MINEURES DE LA FLETRISSERIE BACTERIENNE

La maladie, qui se produit occasionnellement et n'est limitée qu'à certaines régions, s'appelle maladie de la flétrissure mineure. Parfois, on a rapporté un certain nombre de ces maladies en Inde et à l'étranger. En Inde, on constate que les jeunes plants de mûrier sont plus vulnérables à l'attaque par *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler qui provoque la flétrissure de la plantule. Les symptômes comprennent le dessèchement des jeunes plants à partir de l'extrémité de la feuille par la brûlure, qui s'étend à la base de la feuille avec des cercles concentriques à la périphérie et pénètre la tige principale avec le pétiole en l'espace de 10 à 15 jours (Gunasekhar et coll., 1992). On rapporte que les pathogènes fongiques tels que *Phoma exigua* (Dayakar Yadav et Sukumar, 1987), *Mycosphaerella ulmi* (Kleb.) (Misra et coll., 1994) et *Cladosporium chlorocephalum* (Fresen.) Mason et Ellis (Chowdary et coll., 2005) et le pathogène bactérien comme *X. campestris* pv. *mori* provoquent la maladie de la flétrissure de la pousse / de la tige chez le mûrier avec une intensité moyenne de 8 % chez les différentes variétés de mûrier. *P. exigua* affecte les parties tendres de la tige et provoque une décoloration et un noircissement de l'écorce, qui entraîne une flétrissure soudaine des branches et la défoliation. *M. ulmi* se manifeste comme de nombreuses lésions blanc rouge sur la surface inférieure des rameaux de mûrier qui plus tard deviennent des lésions dures, circulaires rouge brique à rouge et recouvrent tout le rameau. *C. chlorocephalum* apparaît sur la tige tendre du mûrier sous la forme de taches marron noir rondes à ovales qui se répandent irrégulièrement sur la pousse entière dans des conditions sévères, quand la mûraie est atteinte par des attaques de parasites. Alors que la maladie progresse la partie affectée devient noire et de forme irrégulière. Dans des conditions sévères, le champignon entraîne la mort et le pourrissement des tissus affectés. *X. campestris* pv. apparaît comme une brûlure marginale du limbe de la feuille et s'étend à la tige / à la pousse, ce qui entraîne l'affaissement de la pousse entière. Jusqu'à présent, on n'a pas rapporté de mesures de lutte pour les maladies de la flétrissure de la plantule et la flétrissure de la pousse / de la tige à l'exception de la flétrissure de la tige provoquée par *P. exigua*, contre laquelle on peut lutter en retirant les branches infestées et avec une vaporisation foliaire de carbendazim à 0,2 % (50 % WP) au moment du bourgeonnement (Sukumar et Padma, 1999).

Au Japon, Takahashi et Sato (1977) ont rapporté la flétrissure par auréole provoquée par une nouvelle souche de *Pseudomonas mori*. La maladie apparaît comme une tache nécrotique avec une auréole sur les feuilles et une chlorose générale de la jeune pousse. La flétrissure dogare de la pousse provoquée par *Diaporthe nomurai* Hara, la flétrissure de la branche [*Stigmata mori* (Nomura) Shirata et Takahashi] et la flétrissure méridionale (*Corticium rolfsii* Curzi) sont des maladies sporadiques de la flétrissure. Les symptômes apparaissent sur la pousse comme des marques circulaires, ovales, en forme de fuseau ou irrégulière avec une apparence huileuse tandis que la flétrissure de la branche se produit sur les pousses des branches sous la forme de tubercules sombres, noirâtres, et marron. On peut prévenir la maladie en brûlant les pousses malades et en évitant les blessures ouvertes. La flétrissure méridionale apparaît sous la forme du pourrissement de la pousse avec les corps sclérotiques du champignon (Fukuchi et Mitsueda, 1982 ; Minamizawa, 1997). Cependant, il n'existe pas de rapports détaillés sur l'épidémiologie et les mesures de lutte contre ces pathogènes.

## IMPACT DES PRATIQUES AGRONOMIQUES SUR LES MALADIES DE LA FLÉTRISSION

En Inde, on sait que des pratiques culturales / agronomiques variées, c'est à dire l'espacement des plantes, les méthodes de taille, l'application équilibrée d'engrais, la lutte contre les mauvaises herbes diminuent la sévérité des flétrissures fongique (*A. alternata* / *F. pallidoroseum*) et bactérienne (*P. syringae* pv. *mori* / *X. campestris* pv. *mori*) à un certain degré chez le mûrier. En plantant le mûrier avec un espacement plus large (90 × 90 cm) et un système de plantation en rangées de deux (150 + 90 × 60 cm), on diminue l'incidence des flétrissures fongique et bactérienne de l'ordre de 23-30 % par rapport à l'espacement plus étroit (60 × 60 cm / 60 × 30 cm), qui crée des conditions idéales pour la multiplication et la propagation des pathogènes (Sharma et coll., 1993 ; 1996). De même, on observe une diminution de la sévérité de la maladie de 21 à 25 % avec une taille moyenne (40 cm au-dessus du niveau du sol) par rapport à une taille basse. L'incidence plus élevée de la maladie dans les parcelles taillées au niveau du sol pourrait être due à l'entrée facile des pathogènes pendant l'hivernation du pathogène présent dans le sol / dans les débris par les extrémités des plantes coupées (Sharma et coll., 1993 ; 1996). Quand on utilise des engrais, on enregistre une incidence bien inférieure (40 à 45 %) des maladies de la flétrissure et lorsqu'on a recours à une quantité élevée de phosphore (300 : 180 : 120 kg NPK) à l'application de bioengrais bactériens (BBP) et de VAM par rapport à l'application d'engrais recommandée (300 : 120 : 120 kg NPK) (Sharma et coll. 1994 ; 1995 ; 1996 ; Govindaiah et Sharma, 2001). Il est important de se débarrasser des mauvaises herbes pour lutter contre les maladies, puisqu'elles agissent comme hôtes alternatifs pour des pathogènes variés de la flétrissure du mûrier. En l'absence des feuilles de mûrier, (après la taille, la récolte des feuilles), ces pathogènes survivent sur de nombreuses mauvaises herbes dicotylédones et sont capables de propager la maladie au mûrier. Les débris de culture sont l'une des principales sources d'inoculum dans la mûraie. Les débris de culture laissés dans la mûraie possèdent souvent l'inoculum des pathogènes sous la forme de spores et de mycelia, qui restent inactives pendant les conditions défavorables et infestent la plante quand les conditions deviennent favorables. Il faut donc se débarrasser convenablement des débris en les brûlant ou en les compostant (Sharma – non publié).

## EFFET DES FEUILLES MALADES SUR LA SANTE DU VER A SOIE

La croissance et le développement sains des vers à soie dépendent en grande partie de la qualité des feuilles de mûrier données en nourriture. De nombreux chercheurs ont rapporté que la qualité nutritionnelle des feuilles de mûrier influence considérablement la croissance et la production de cocons (Qadri et coll., 1998 ; 1999). Des études biochimiques et physiologiques ont révélé que les feuilles de mûrier infestées par la flétrissure ont une mauvaise qualité nutritive à cause de la baisse de l'humidité de la feuille, et de la teneur en protéines, en sucre, etc. L'alimentation des vers à soie

avec des feuilles infestées a un effet sur les paramètres d'élevage, de dévidage et de grainage (Raju, 1998). La baisse des caractères économiques pourrait être due à l'alimentation avec des feuilles de mauvaise qualité, surtout déficientes en protéines, ce qui est l'un des nutriments les plus essentiels pour les vers à soie puisque la protéine de la feuille est convertie en protéine de soie (séricine et fibroïne) par un processus biologique chez le ver à soie (Fukuda et coll., 1959 ; Takeuchi, 1960).

## **VOLUME DE VAPORISATION ET TOXICITE RESIDUELLE POUR LE VER A SOIE**

Le volume de vaporisation requis pour les maladies de la flétrissure du mûrier est classé en trois groupes tels que volume élevé (HV), volume faible (LV) et volume ultra faible (ULV). La solution nécessaire de fongicide par hectare pour vaporiser sur le feuillage en fonction de HV, LV et ULV est comprise respectivement entre 450-600 litres, 250 à 400 litres et 5 litres. On peut utiliser la technique HV quand la maladie est très sévère dans les mûraies (plus de 50 %), tandis qu'on peut adopter le LV pour les terrains modérément affectés (moins de 50 %) par la maladie. Cependant, par mesure prophylactique / préventive, on peut suivre la technique ULV (Sharma – non publié). Après la vaporisation des fongicides, le souci principal est l'effet résiduel pour les vers à soie puisque les vers à soie sont très sensibles aux produits chimiques. Il faut procéder à l'évaluation biologique du fongicide vaporisé avant d'utiliser les feuilles de mûrier pour l'élevage du ver à soie. Les fongicides recommandés utilisés pour lutter contre les maladies de la flétrissure chez le mûrier n'ont pas de toxicité résiduelle pendant une longue durée et on peut utiliser les feuilles vaporisées sans risque pour l'élevage du ver à soie une semaine après la vaporisation foliaire. Si on teste / on essaie un nouveau fongicide et que l'on ne connaît pas la durée sans danger, on peut la trouver en consultant les différentes marques triangulaires colorées sur le paquet de fongicide rouge / jaune, bleu et vert qui correspondent à des périodes sans risque respectivement de 15-20, 5-7 et 3 à 5 jours.

## **STRATEGIES POUR LUTTER CONTRE LES MALADIES DE LA FLETRISSURE**

Pour lutter de manière efficace contre les maladies, il faut avoir des connaissances sur le diagnostic correct et juste de la maladie. Grâce à cela, on peut éviter la maladie à la plante en adoptant des mesures de lutte adaptées. Dans le monde entier, la méthode la plus courante et efficace pour lutter contre les maladies de la flétrissure chez le mûrier sont les fongicides chimiques. Les approches de lutte biologique et les substances botaniques sont très efficaces en laboratoire et en serre mais ces approches sont moins efficaces sur le terrain surtout quand l'intensité de la maladie est très élevée. Il est donc nécessaire de mettre au point une stratégie de gestion intégrée de la maladie en combinant toutes les composantes possibles comme l'application judicieuse de fongicides (dose sub-mortelle), de substances botaniques et d'agents de lutte biologique efficaces pour lutter contre les maladies de la flétrissure chez le mûrier. De plus, il est nécessaire d'étudier les différents isolats des pathogènes de la flétrissure et l'interaction hôte – pathogène pour mettre au point des stratégies efficaces de lutte contre la maladie. On peut employer les approches moléculaires comme la RFLP, la RAPD et les techniques axéniques / de culture des cellules pour comprendre l'interaction hôte / pathogène au niveau moléculaire, de manière à mettre au point des méthodes appropriées pour faire face aux pathogènes de la flétrissure. Il faut privilégier la recherche sur la mise au point de modèles d'avertissement / de prévision des maladies adaptés aux différentes zones agro-climatiques pour un programme intégré de lutte contre les maladies.

## DETECTION AND IDENTIFICATION OF PHYTOTOXIC SUBSTANCES FROM MULBERRY LEAVES INOCULATED WITH *MYROTHECIUM VERRUCARIA*, A PATHOGEN OF *MYROTHECIUM* LEAF SPOT OF MULBERRY

R. MURAKAMI<sup>1</sup>, S. HIRADATE<sup>2</sup>, A. SHIRATA<sup>3</sup> & W. MITSUHASHI<sup>1</sup>

1. National Institute of Agrobiological Sciences, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan.
2. National Institute for Agro-Environmental Sciences, 3-1-3, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan.
3. National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan.

*Myrothecium verrucaria* has been recognized as a pathogen of *Myrothecium* leaf spot causing a mulberry disease. Culture extract of *M. verrucaria* showed phytotoxicity to many plant species and enhanced the lesion formation caused by *M. verrucaria* conidia on the plants. Verrucarins A and J, roridin A were isolated from the culture as phytotoxic substances. The phytotoxic substance in the largest amounts was verrucarins J, followed by verrucarins A, roridin A, and a small amount of an unidentified toxin was also produced. In the mulberry leaves inoculated with *M. verrucaria* and which developed the disease, verrucarins A, roridin A, and an unidentified toxin were detected but verrucarins J was not. Therefore, verrucarins A, roridin A, and the unidentified toxin may play some roles as pathotoxins in the pathogenicity of the fungus but verrucarins J does not seem to be involved.

**Keywords:** *Myrothecium verrucaria*, mulberry leaf spot, roridin, trichothecenes, verrucarins.

### INTRODUCTION

Fungus *Myrothecium verrucaria* (Alb. and Schweim.) Ditmar ex Fr. has been recognized as a pathogen of mulberry *Myrothecium* leaf spot of disease (Murakami *et al.*, 2005) and it has been known as a producer of mycotoxins called trichothecenes (Jarvis *et al.*, 1983; Jarvis and Yatawara, 1986). Trichothecenes are sesquiterpenoid epoxides produced by the fungal genera *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* and *Trichothecium*, and are potent inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells (Jarvis *et al.*, 1983). The role of the trichothecenes produced by several pathogenic fungi has been already examined by various authors. The production of trichothecenes of *Fusarium* and *Myrothecium* is thought to contribute to their virulence (Harris *et al.*, 1999; Kuti *et al.*, 1989; Murakami *et al.*, 2004; Proctor *et al.*, 1995). However, there are several strains of *Myrothecium* which do not produce trichothecenes (Bean *et al.*, 1992) and the role of trichothecenes in pathogenicity of *M. verrucaria* has not been studied until now. Therefore in the present study, we examined whether *M. verrucaria* produced trichothecenes or not, and isolated phytotoxic substances from a culture of *M. verrucaria* and from diseased leaves attacked by the fungus.

### MATERIALS AND METHODS

#### Used Fungus:

The *Myrothecium verrucaria* strain M95083 was isolated from mulberry leaves in a mulberry field in the Akagi Pref., Japan (Murakami *et al.*, 2005) and was cultured on potato sucrose agar medium (PSA: 2% sucrose and 1.8% agar in 20% potato broth) (Booth, 1971) at 25°C.

#### Mulberry leaves preparation:

Mulberry cultivar "Shin ichinose" was grown in the mulberry field of the National Institute of Agrobiological Sciences (Tsukuba, Japan). The field was plowed up to control weeds and the soil was determined to be free from *M. verrucaria*. Mulberry leaves were harvested at approximately 30 cm below the top of the branches and sterilized with 70% ethanol. The leaves were punctured with a bundle of 10 needles. Treated leaves were incubated in a plastic case (22 × 30 × 6.5 cm) with moistened filter paper at 25 ± 1°C.

**Table I. Cultivars of mulberry used in this study.**

**Tableau I. Cultivars de mûrier utilisés dans cette étude.**

|                 |                     |                 |                 |                  |                |
|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------|
| Akagi           | Hekikaiooha         | Kanadasannsou-A | Large           | Rohachi          | Shiwasuguwa    |
| Alugeria-atsuba | Hiroeguwa           | Kanadasannsou-B | Mikuniguwa      | Ruimu            | Sodefuri       |
| Aobanezumi      | Homare              | Kankou 3        | Minamisakari    | Ryoumennsou      | Shuukaku ichi  |
| Asayuki         | Ichibei             | Kannmasari      | Miran 4         | Ryusennshuuu     | Surukutotto    |
| Atsubamidori    | Ichinose            | Kannrakusou     | Miran 5         | Sekaiichi        | Syamu          |
| Beikoku 13      | Isen-K              | Kataneo         | Mirienoaru      | Shidareguwa      | Tachibanasou   |
| Bekkougawa      | Itouwase            | Keikansou       | Murasakiwase    | Shimanouchi      | Tagowase       |
| Daikokusou      | Jimosutoki          | Kenmochi        | Nakazawa        | Shimoshirazu     | Takinokawa     |
| Fukayuki        | Juumonji            | Kibajuumonji    | Negoyata kasuke | Shin ichinose    | Tenmokuyotsume |
| Fukushima ooba  | Kairyô ichinose     | Kobuchzawa 1    | Nuregarasu      | Shinkenmochi     | Tokiyutaka     |
| Fusoumaru       | Kairyô nezumigaeshi | Kokusou 13      | Obata           | Shinkokuyasou    | Tougounishiki  |
| Garyuu          | Kairyô roguwa       | Kokusou 20      | Okudawase       | Shinshironishiki | Tsuruta        |
| Gorougiwase     | Kairyô ruu          | Kokukou 27      | Onnnatomikuni   | Shiratama        | Uzubesugaya    |
| Hachijouguwa    | Kairyowase          | Kokusou 70      | Philippine      | Shirome keisou   | Yukishinogi    |
| Hayatesakari    | Jumonji             | Kumagayasou     | Pionyesuki      | Shirome rosou    | Yukihirazu     |

### Examination of pathogenicity of *M. verrucaria*:

Three inocula: conidial suspension (C), extract of culture (E) and mixture of conidia and E (CE) of *M. verrucaria* were inoculated onto the intact leaves or punctured leaves of 90 mulberry cultivars (Table I) and onto intact leaves or punctured leaves of 108 species belonging to 45 different families of plants (Table II). The conidia of *M. verrucaria* strain M95083 on two-week-old PSA culture were collected and rinsed in distilled sterilized water (DSW) three times to remove the mycotoxins secreted by the fungus into the culture (rinsed conidia). The rinsed conidia were suspended in DSW at  $10^7$  conidia/ml, and 10  $\mu$ l of the suspension in DSW was inoculated as C inoculum. Two-week-old cultures (20 ml) of *M. verrucaria* were dried, and the compounds in the culture were extracted with 20 ml of DSW. Then, the extracted water was filtered (pore size: 0.22  $\mu$ m; Minisart, Sartorius, Gottingen, Germany), and 10  $\mu$ l of the extract was inoculated as E inoculum. Rinsed conidia were suspended in E at  $10^7$  conidia/ml, and 10  $\mu$ l of the suspension was inoculated as CE inoculum. The treated leaves were incubated in a plastic case and were examined seven days after the inoculation. The infection rates and diameters of the lesion caused by C and CE inocula, and the percentage of necrosis emergence and diameter of the necroses caused by E inoculum were examined.

Averages and standard errors of percentages and diameters caused by each inoculum were calculated from averages of each mulberry cultivar and of each plant species inoculated with each inoculum. For examination of effects of phytotoxic substances in E inoculum on lesion development, ANOVA analysis was performed on averages of infection rates and diameters of lesion between C inoculum and CE inoculum on mulberry cultivars ( $n = 90$ ) and on plants different species ( $n = 108$ ).

### Extraction and purification of phytotoxic substances from PSA culture of *M. verrucaria*:

The method for isolation of phytotoxic substances produced by *M. verrucaria* is modified method for isolation of toxic substances produced by *M. roridum* (Murakami *et al.*, 2004). *M. verrucaria* strain M95083 was incubated on a total of 2000 ml of PSA in 100 petri dishes (diam. 9 cm) at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  for one month. The culture was dried, and then compounds in the culture were extracted with 2000 ml of methanol with shaking at 60 rpm for 1 h. This extraction was repeated three times. The methanol extract was evaporated. The residues were then dissolved in each of 400 ml of water and ethyl acetate and then shaken. The ethyl acetate-soluble layer was evaporated and then dissolved in 500  $\mu$ l of methanol. It was subjected to normal-phase liquid-chromatography (NPLC) by using 24 g of Wakogel C-300 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) with a stepwise elution with 120 ml of each of 8 elutants. The toxic subfractions were subjected to reversed-phase liquid-chromatography (RPLC) by using 5 g of Cosmosil 140 C<sub>18</sub>-OPN (Nacalai Tesque Industries, Kyoto, Japan) and eluted stepwise with 25 ml of aqueous methanol. Each toxic subfraction was subjected to HPLC (LC 10A system, Shimadzu Industries, Kyoto, Japan) with an ODS-II column (Shimadzu-Techno Research Industries, Kyoto, Japan) using 60% of aqueous methanol and 20% or 30% of aqueous isopropanol (flow rate 1 ml/min) at  $40^\circ\text{C}$  at a wavelength of 260 nm. The procedure of production, extraction and purification of the phytotoxic substances produced by *M. verrucaria* is shown in Figure 1.

To examine existence of phytotoxic substances in the subfractions, each resultant extract was dried and dissolved with 0.1% of methanol. The resultant fraction solutions (20  $\mu$ l, more than 100 ppm) were dropped onto the punctured parts of mulberry leaves. As a control, 20  $\mu$ l of 0.1% of methanol was dropped onto additional punctured parts on the same leaves and they were confirmed not to affect the leaves. Toxic activity was evaluated by the extent of necrosis that emerged on the part of the leaf within seven days after the application.

Table II. Tested plants in this study.

Tableau II. Plantes testées dans cette étude.

|                                                                                                                            |                                                                                                                                                                            |                                                                                       |                                                                      |                                                                                                                         |                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <Agavaceae><br><i>Dracaena cordylina</i>                                                                                   | <i>Eclipta prostrata</i><br><i>Erigeron philadelphicus</i>                                                                                                                 | <Daphniphyllaceae><br><i>Daphniphyllum</i><br><i>macropodium</i>                      | <Leguminosae><br><i>Pueraria lobata</i>                              | <Orchidaceae><br><i>Bletilla striata</i>                                                                                | <i>Paederia scandens</i><br><Rutaceae>                                               |
| <Amaranthaceae><br><i>Amaranthus lividus</i><br><i>A. palmeri</i><br><i>A. viridis</i><br><i>Celosia cristata</i>          | <i>Gnaphalium affine</i><br><i>G. japonicum</i><br><i>Kalimeris yomena</i><br><i>Lactuca sativa</i><br><i>Prenanthes tanakae</i>                                           | <Ericaceae><br><i>Rhododendron indicum</i>                                            | <i>Trifolium repens</i><br><i>Vicia sepium</i><br><i>Glycine max</i> | <i>Cymbidium seaside</i><br><Osmundaceae><br><i>Osmunda japonica</i>                                                    | <i>Poncirus trifoliata</i><br><Saururaceae><br><i>Houttuynia cordata</i>             |
| <Amaryllidaceae>                                                                                                           | <i>Senecio nikoensis</i>                                                                                                                                                   | <Fagaceae><br><i>Quercus glauca</i>                                                   | <Liliaceae><br><i>Aloe arborescens</i><br><i>Tulipa kaufmanniana</i> | <Oxalidaceae><br><i>Oxalis corniculata</i>                                                                              | <Saxifragaceae><br><i>Hydrangea macrophylla</i>                                      |
| <i>Narcissus tazetta</i><br><Begoniaceae><br><i>Begonia semperflorens</i>                                                  | <i>Solidago altissima</i><br><i>Sonchus oleraceus</i><br><i>Taraxacum platycarpum</i>                                                                                      | <Geraniaceae><br><i>Pelargonium</i><br><i>graveolens</i>                              | <Magnoliaceae><br><i>Magnolia denudata</i>                           | <Phytolaccaceae><br><i>Phytolacca esculenta</i>                                                                         | <i>Solanum nigrum</i><br><i>S. tuberosum</i>                                         |
| <Cactaceae>                                                                                                                | <i>Zinnia elegans</i>                                                                                                                                                      | <i>Alopecurus aequalis</i><br><i>Digitaria adscendens</i>                             | <Malvaceae>                                                          | <i>Plantago asiatica</i>                                                                                                | <i>Lycopersicon</i><br><i>esculentum</i><br><Theaceae>                               |
| <i>Schlumbergera bridgesii</i>                                                                                             | <Convolvulaceae>                                                                                                                                                           | <i>Echinochloa crus-galli</i>                                                         | <i>Abutilon avicennae</i>                                            | <Polygonaceae>                                                                                                          | <i>Camellia japonica</i>                                                             |
| <Chenopodiaceae><br><i>Beta vulgaris</i><br><i>Chenopodium album</i><br><i>C. centrorubrum</i><br><i>Spinacia oleracea</i> | <i>Pharbitis nil</i><br><Crassulaceae><br><i>Crasula portulacea</i><br><Cruciferae><br><i>Brassica campestris</i><br><i>B. chinensis</i><br><i>Capsella bursa-pastoris</i> | <i>E. esculenta</i>                                                                   | <i>Gossypium arboreum</i>                                            | <i>Polygonum</i><br><i>laphathifolium</i><br><i>P. longisetum</i><br><i>P. persicaria</i><br><i>Reynoutria japonica</i> | <Ulmaceae><br><i>Zelkova serrata</i><br><Urticaceae><br><i>Boehmeria nipononivea</i> |
| <Commelinaceae><br><i>Commelina communis</i><br><Compositae>                                                               | <Cucurbitaceae>                                                                                                                                                            | <i>Setaria viridis</i><br><i>Zea mays</i><br><i>Zoysia japonica</i>                   | <i>Humulus scandens</i><br><Musaceae><br><i>Musa acuminata</i>       | <Portulacaceae><br><i>Portulacea oleracea</i><br><Rosaceae><br><i>Cerasus yedoensis</i><br><i>Eriobotrya japonica</i>   | <Violaceae><br><i>Viola mandshurica</i><br><Vitaceae><br><i>Cayratia japonica</i>    |
| <i>Artemisia indica</i>                                                                                                    | <i>Cucumis sativus</i>                                                                                                                                                     | <Hamamelidaceae><br><i>Liquidambar</i><br><i>styraciflua</i><br><Iridaceae>           | <i>Bougainvillea glabra</i>                                          | <i>Malus × cerasifera</i>                                                                                               | <i>Parthenocissus</i><br><i>tricuspidata</i>                                         |
| <i>Aster fastigiatus</i>                                                                                                   | <i>Cucurbita moschata</i>                                                                                                                                                  | <i>Sisyrinchium</i><br><i>graminoides</i><br><Labiatae><br><i>Lamium amplexicaule</i> | <Oleaceae><br><i>Osmanthus fragrans</i><br><i>O. heterophyllum</i>   | <i>Photinia glabra</i><br><i>Prunus salicina</i><br><i>Pyrus serotina</i>                                               | <Zingiberaceae><br><i>Alpinia zerumbet</i>                                           |
| <i>Crysanthemum indicum</i><br><i>Cirsium lucens</i><br><i>Conyza bonariensis</i><br><i>Dahlia pinnata</i>                 | <Cyperaceae><br><i>Carex thunbergii</i><br><i>Cybebus flavidus</i><br><i>C. microiria</i>                                                                                  | <Onagraceae><br><i>Oenothera tetrapectera</i>                                         | <Nyctaginaceae>                                                      | <Rubiaceae>                                                                                                             |                                                                                      |

### Identification of isolated phytotoxic substances:

Purified substances were dissolved in chloroform-d (Aldrich, Tokyo, Japan) containing 0.2% tetramethylsilane and measured  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance (NMR) and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra by an using ARX-400 spectrometer (Bruker, Tokyo, Japan) or a JNM alpha 600 FT-NMR System (JEOL, Tokyo, Japan). Mass spectra were measured by using by a JMS-SX 102A or a JNS SX 120A (JEOL) after the sample dissolved in isobutane.

### Thin-layer chromatography (TLC) bioassay method:

The method for detection of phytotoxic substances from mulberry leaves inoculated with *M. verrucaria* is modified method for detection of toxic substances produced by *M. roridum* (Murakami *et al.*, 2004). To identify the phytotoxic substances on the diseased leaves inoculated with *M. verrucaria*, extracts of diseased leaves were subjected to TLC bioassay method (Murakami and Shirata, 1998).

The rinsed conidia of *M. verrucaria* strain M95083 were suspended in DSW at  $10^6$  conidia/ml. Mulberry leaves (200 g) were cut into pieces (about  $1.5 \times 1.5$  cm) and soaked in the conidial suspension. Then the inoculated leaf pieces were incubated in a plastic case with filter paper at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  and sampled every other days for 14 days. The sampled leaves were dried at  $80^\circ\text{C}$  for eight hours in a windy oven (WFO-450ND, EYELA, Tokyo), pulverized by a mill (MCG-180, Matsubara, Osaka) for three minutes and stored in a desiccator with phosphoric anhydride at  $5^\circ\text{C}$ . The pulverized leaves were soaked in 1500 ml of methanol shaking at 90 rpm for one hour and this extraction was repeated three times. The methanol extract was evaporated and dissolved into 100 ml of methanol. Forty micro liters of the methanol extract was put on the TLC plate (DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merk, Darmstadt, Germany) in a diethyl ether following TLC bioassay method (Murakami and Shirata, 1998). Conidia of the fungal strain M9401, which was sensitive to mycotoxins produced by *Myrothecium* (Murakami and Shirata, 1998), were sprayed on the TLC plate to detect mycotoxins in the extracts. Then the plate was incubated in a plastic case with moistened filter paper at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### Measurement of phytotoxic substance concentration in diseased leaves:

The method for measurement of phytotoxic substances concentration from mulberry leaves inoculated with *M. verrucaria* is modified method for detection of toxic substances produced by *M. roridum* (Murakami *et al.*, 2004). To determine the concentration of the phytotoxic substances in the diseased leaves, the above methanol extracts from diseased leaves were subjected to the procedure designed in Figure 1. However, there were some differences between the methods. RPLC fraction did not perform because the extract from NPLC fraction was little. Each subtoxic NPLC fraction (20  $\mu\text{l}$  of 1000 ppm) and purified substances were subjected to HPLC with an ODS-II column using 60% of aqueous methanol (flow rate 1 ml/min) at  $40^\circ\text{C}$  and determined at a wavelength of 260 nm to measure concentration of the phytotoxic substances. The substances in the diseased leaves were identified by comparing the retention times of the HPLC analysis with those of the purified substances and the concentration of each substance in the diseased leaves was calculated on the basis of peak area obtained through an integrator (C-R6A Chromatopac, Shimadzu).

## RESULTS

### Phytotoxicity of *M. verrucaria* to plants

Results concerning percentages of infection, necroses emergence and lesion emergence and their diameters in mulberry cultivars and in other plants are shown in Figs. 2 and 3. *M. verrucaria* conidia did not infect intact mulberry leaves (Fig. 2, upper) but infected 8% of the punctured mulberry leaves of different cultivars (diameter of the lesion: 1.6 mm). E inoculum caused necroses with necrotic veins on the intact leaves of mulberry cultivars (infection rate: 91%, diameter of the lesion: 8 mm) and on the punctured cultivars (infection rate: 100%, diameter of the lesion: 13 mm).

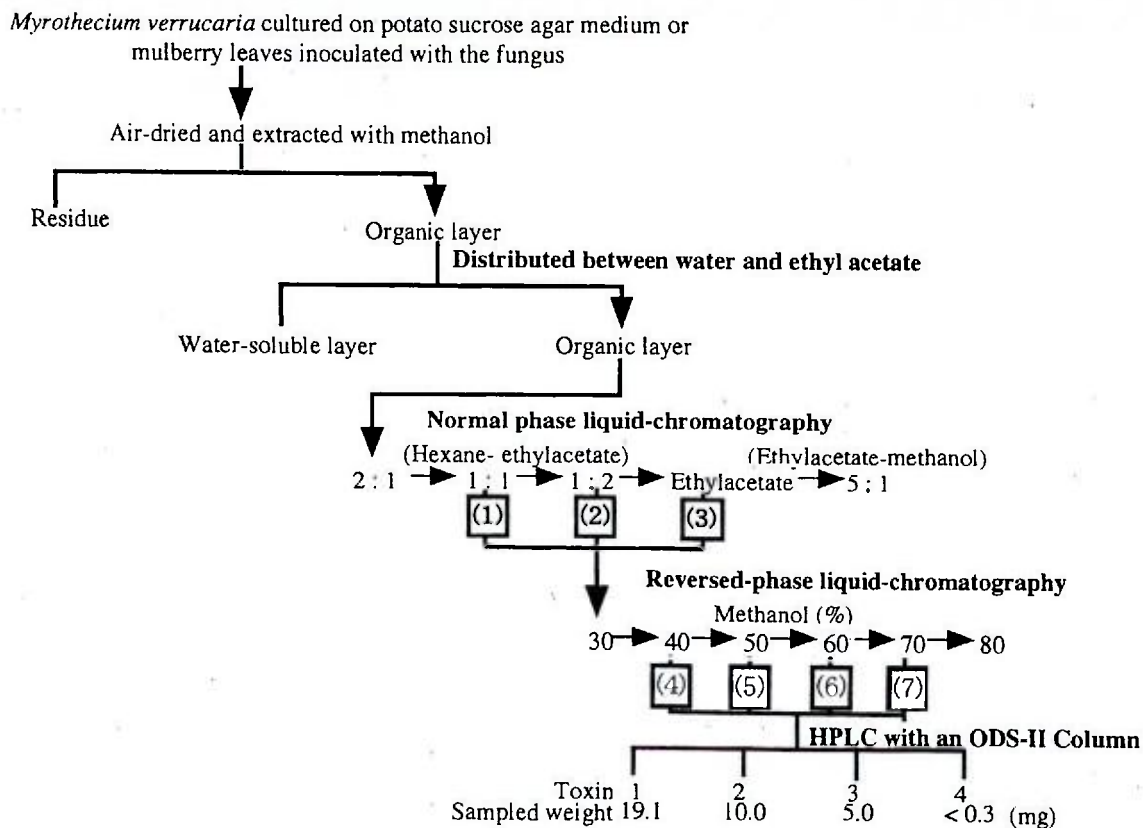


Figure 1. Procedure of extraction and purification of toxins from *M. verrucaria* in potato sucrose agar culture medium and in mulberry leaves inoculated with the fungus. The code for each fraction is shown in parentheses.

Figure 1. Procédure d'extraction et de purification des toxines de *M. verrucaria* dans un milieu de culture d'agar de saccharose de pomme de terre et dans les feuilles de mûrier inoculées avec le champignon. Le code pour chaque fraction apparaît entre parenthèses.

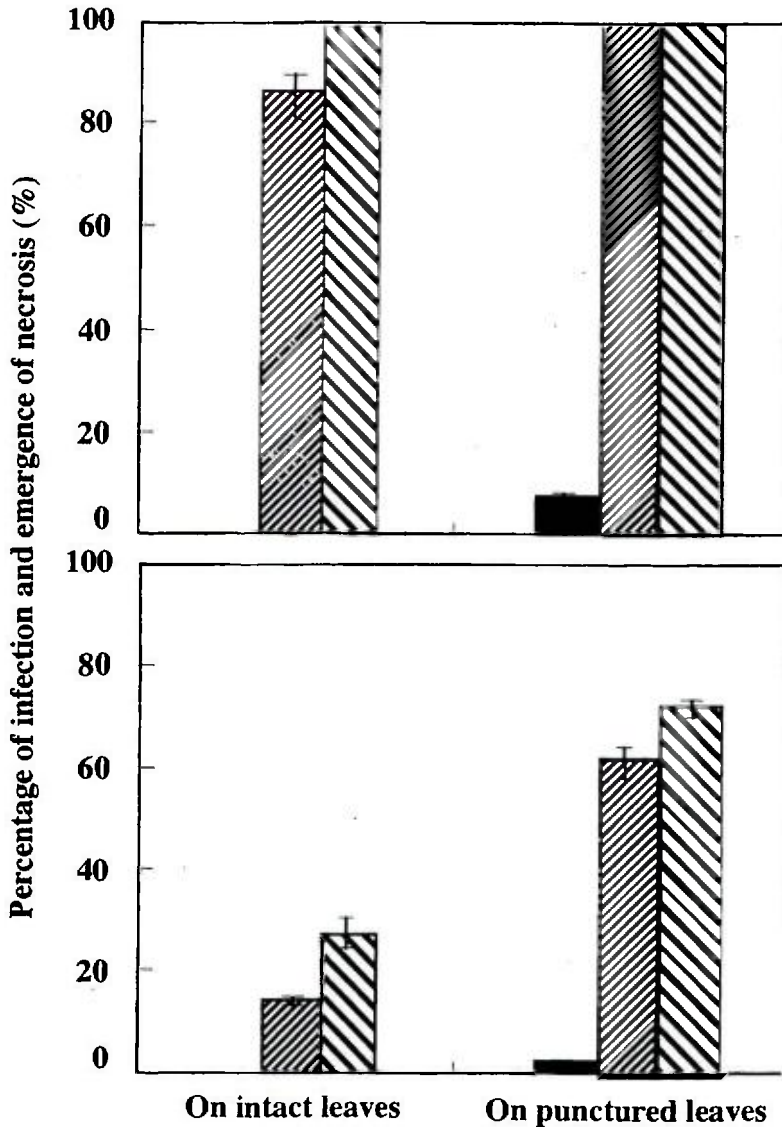


**Figure 2. Percentages of infection or necrosis emergence caused by inocula of *M. verrucaria*.**

Conidia: ■, extract of culture: ▨ and a mixture of conidia and extract of culture: ▩ on intact (left) and on punctured (right) leaves of 90 mulberry cultivars (upper) and of 108 plant species belonging to 49 different families (bottom). Bars in figure are standard errors of average percentages ( $n = 90$  for mulberry cultivars and  $n = 108$  for different plant species).

**Figure 2. Pourcentages d'infestation ou émergence de la nécrose provoqués par les inoculum de *M. verrucaria*.**

(conidies : ■, extrait de culture : ▨, un mélange de conidies et d'extrait de culture : ▩) sur des feuilles intactes (à gauche) et perforées (à droite) de 90 cultivars de mûrier (au-dessus) et de 108 espèces de plantes appartenant à 49 familles différentes (en bas). Les barres dans la figure sont les écarts types des pourcentages moyens ( $n = 90$  pour les cultivars de mûrier et  $n = 108$  pour les différentes).

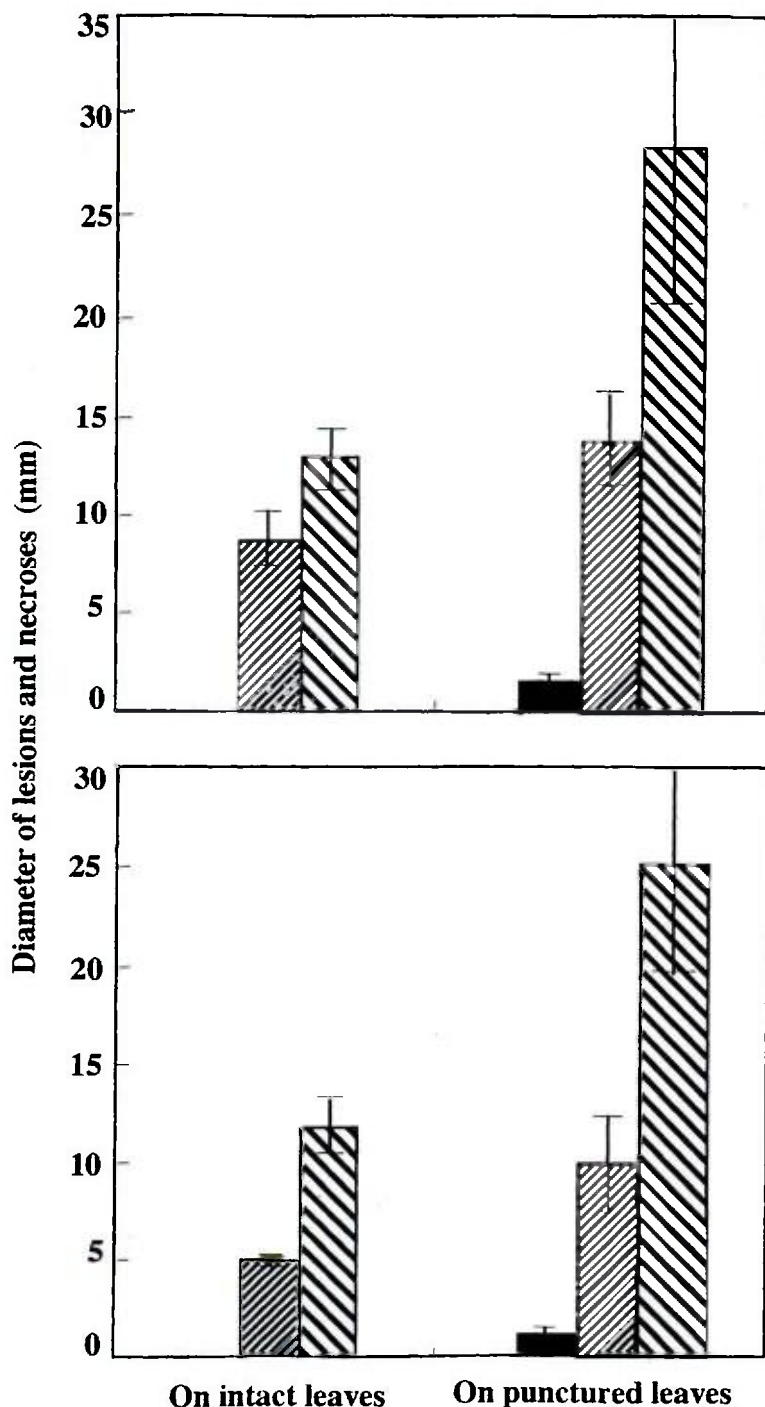


Figure 3. Diameter of lesion or necroses caused by inocula of *M. verrucaria*

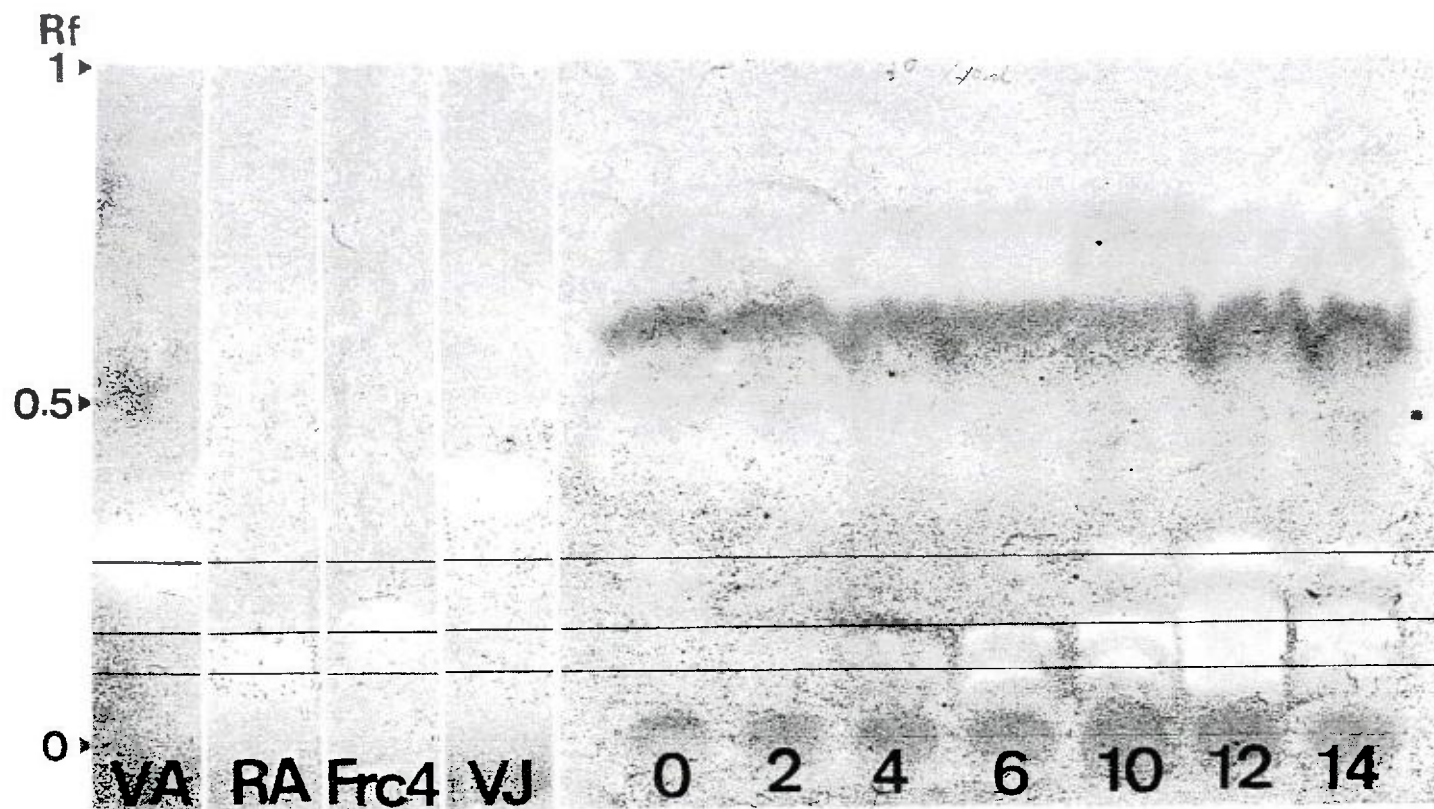
(conidia:  and extract of culture:  a mixture of conidia and extract of culture:  on intact (left) and on punctured (right) leaves of 90 mulberry cultivars (upper) and of 108 plant species belonging to 49 different families (bottom).

Bars in figure are standard errors of average diameters ( $n = 90$  for mulberry cultivars and  $n = 108$  for different plant species).

Figure 3. Diamètre de la lésion ou des nécroses provoquées par les inoculum de *M. verrucaria*

(conidies :  et extrait de culture  mélange de conidies et extrait de culture  sur des feuilles intactes (à gauche) et perforées (à droite) de 90 cultivars de mûrier (en haut) et de 108 espèces de plantes appartenant à 49 familles différentes (en bas).

Les barres dans la figure sont les écarts types pour les diamètres moyens ( $n = 90$  pour les cultivars de mûrier et  $n = 108$  pour les différentes espèces de plantes).



R. MURAKAMI

**Figure 4.** Detection of phytotoxic substances in diseased leaves by thin-layer chromatography bioassay method (Murakami and Shirata, 1998) after 0 to 14 days inoculation of *M. verrucaria*. VA: verrucarín A; RA: roridin A; Frc4: the unidentified toxin; VJ: verrucarín J.

*Figure 4. Détection des substances phytotoxiques dans les feuilles malades par la méthode d'évaluation biologique par chromatographie sur couche mince (Murakami et Shirata, 1998) après 0 à 14 jours d'inoculation de M. verrucaria. VA : verrucarine A ; RA : roridine A ; Frc4 : toxine non identifiée ; VJ : verrucarine J.*

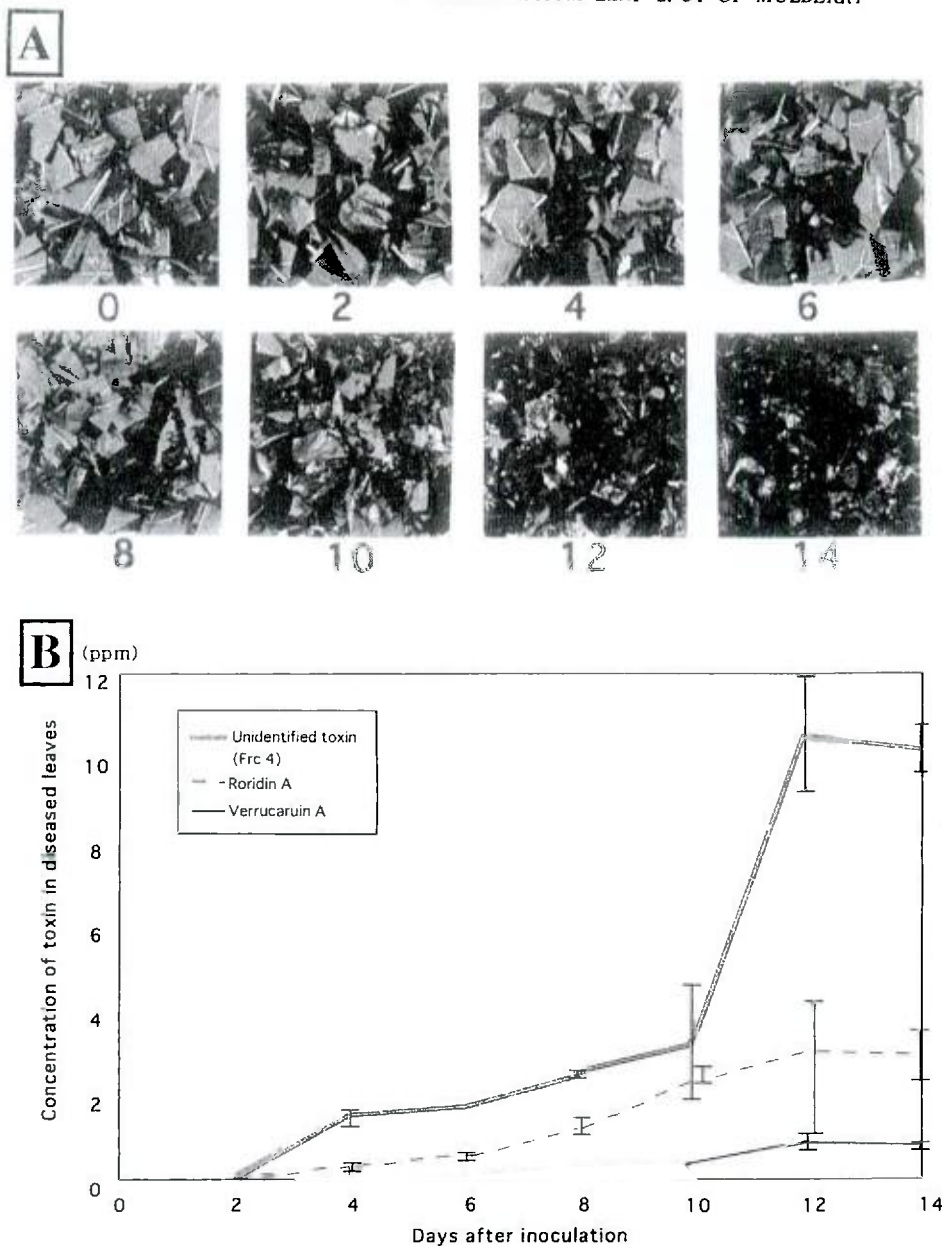


**Figure 5. Concentration of phytotoxic substances in diseased leaves inoculated with *M. verrucaria*.**

(A) Photographs of treated leaves in a plastic case under each sampling period are shown. Numbers under the photographs indicate days after the inoculation.

(B) Changes of phytotoxic substances recorded for each sampling days. Bars in figure are standard errors of average concentration ( $n = 3$ ).

**Figure 5. Concentration des substances phytotoxiques dans les feuilles malades inoculées avec *M. verrucaria*.**

(A) Photographies des feuilles traitées dans une boîte en plastique pour chaque période d'échantillonnage. Les nombres sous les photographies indiquent les jours après l'inoculation.

(B) Changements des substances phytotoxiques enregistrés pour chaque jour d'échantillonnage. Les barres dans la figure sont les écarts types pour la concentration moyenne ( $n = 3$ ).

CE inoculum infected all the intact (diameter of the lesion: 12 mm) and punctured leaves (diameter of the lesion: 28 mm) (Fig. 3, upper).

For 108 plant species, *M. verrucaria* conidia did not infect intact leaves (Fig. 2, bottom) but infected 1.9% of the punctured plants (diameter of the lesion: 1 mm) (Fig. 3, bottom). E inoculum caused necroses with necrotic veins on the plant leaves (percentage of necrosis emergence: 13.9% and diameter of the necrosis: 5 mm on the intact plants, percentage of necrosis emergence: 61.1% and diameter of the necrosis: 9 mm on the punctured plants), and the highest infection rate was observed in CE inoculation (infection rate: 26.9% and diameter of the lesion: 11 mm on the intact plants, infection rate: 70.7% and diameter of the lesion: 25 mm on the punctured plants).

There were significant differences in infection rate averages and in averages of diameter between C inoculum and CE inoculum on intact mulberry cultivar leaves and on intact plant species leaves ( $p < 0.001$ , at ANOVA). Moreover, There were also significant differences in them between C and CE inocula on punctured mulberry cultivar leaves and on punctured plant species leaves ( $p < 0.001$ , at ANOVA). The results suggested that phytotoxic substances existed in the culture extract and they caused increase of diameter of lesion inoculated with *M. verrucaria* conidia.

#### Phytotoxic substances produced on PSA medium:

Subfractions from (1) to (7) in Figure 1 showed toxicity to mulberry leaves, and four species of phytotoxic substances were isolated by HPLC. NMR and mass spectrometry analyses of these fractions revealed that these substances are roridin A, verrucarins A and J. Roridin A (Mw: 532) was found in subfractions (1) and (7) (Bohner and Tamm, 1966; Harri *et al.*, 1962; Jarvis *et al.*, 1983). Verrucarins A (Mw: 502) was detected in subfractions (2) and (5) (Gutzwiller and Tamm, 1965; Jarvis *et al.*, 1983; Jarvis and Yatawara, 1986), and verrucarins J (Mw: 500) was eluted in subfractions (2) and (6) (Fetz *et al.*, 1965; Jarvis *et al.*, 1983; Jarvis and Yatawara 1986). Roridin A and verrucarins A and J belong to trichothecenes. The fourth toxin (Frc 4) was detected in subfractions (3) and (4), and the total sampled weight of this compound was too small in order to identify it, but from the spectrum data of  $^1\text{H-NMR}$  it is probably a trichothecene.

#### Detection of phytotoxic substances in diseased leaves by TLC bioassay method:

Mulberry leaves inoculated with conidia of *M. verrucaria* were incubated for 0 to 14 days, and the methanol extracts of the diseased leaves were subjected to TLC bioassay method (Fig. 4). Because the fungal strain M9401 was sensitive to mycotoxins produced by *Myrothecium*, growth of the fungus was inhibited on the areas where the mycotoxins on TLC plate were developed. Therefore, the areas looked as white spots. On the other hand, color of areas where mycotoxins were not developed was black. Extract from the white spots on TLC showing inhibition of M9401 growth were toxic to mulberry leaves, and extract from other than the spots did not show toxicities. As results, they would be identical to verrucarins A ( $R_f$ : retention factor = distance traveled by the compound / distance traveled by the developed solvent front: 0.28), roridin A ( $R_f$ : 0.1) and Frc 4 ( $R_f$ : 0.17) by comparison  $R_f$  value of the spot of extract from disease leaves with  $R_f$  values of the purified phytotoxic substances. Roridin A and Frc 4 were detected after 6 days of treatment, and verrucarins A was detected after 10 days but verrucarins J ( $R_f$ : 0.39) was not detected.

#### Phytotoxic substances concentrations in diseased leaves:

First, color of the leaf pieces inoculated with *M. verrucaria* was green and began to turn brown from edges of the pieces 4 days after the inoculation (Fig. 5, upper). At 6 days, brown spots appeared the inside of the pieces, and then color of brown areas changed to black and hyphae of the fungus grew on the pieces after 8 days. At 10 days, conidia formed on the pieces and then the necrotic areas spread over the whole pieces. In Figure 1, only subfraction (3) from leaves 2 days after the inoculation showed toxicity to the mulberry leaves, and subfractions from (1) to (3) from leaves 14 days after the inoculation showed toxicity to the leaves. The fraction at a retention time of 6.9 min by HPLC showed

toxicity to mulberry leaves, and this was identical to Frc 4. Frc 4 was detected in diseased leaves from the 2nd to the 14th day after inoculation. The concentration of Frc 4 was the highest (10.5 ppm) at the 12th day (Fig. 5, bottom). The fraction at a retention time of 9.9 min showed toxicity to mulberry leaves, and this peak was identical to verrucarins A. The concentration of verrucarins A was the highest (2.0 ppm) at the 12th day. The fraction at a retention time of 11.9 min showed toxicity to mulberry leaves, and this peak was identical to roridin A. The concentration of roridin A was the highest (2.5 ppm) at the 12th day.

## DISCUSSION

*M. verrucaria* is known as a pathogen of many plants (Yang and Jong, 1995a, 1995b) and as a producer of trichothecenes (Jarvis *et al.*, 1983; Jarvis and Yatawara, 1986). However, the infection mechanism of *M. verrucaria* has not been studied. In this paper, the extract from culture media of *M. verrucaria* caused necroses on plants and enhanced lesion formation caused by conidia of the fungi. Similar tendencies were observed in case of *M. roridum*, a pathogen causing of Myrothecium leaf spot, one of the mulberry diseases (Murakami and Shirata, 1998). *M. roridum* also produces trichothecene and it may play some roles in the pathogenicity of the fungus (Murakami *et al.*, 2004).

Many pathogens growing *in vitro* secrete toxic substances which induce some or all of the symptoms associated with infection by the pathogen on the host plants. Because these substances are capable of disrupting metabolism and have low molecular weights, they are described as toxins. These toxins are highly mobile within plants. Therefore, they would work at a distance from the actual site of infection (Dickinson and Lucas, 1982). The trichothecenes produced by *M. verrucaria* might move into the leaf along the veins similarly to toxins produced by *M. roridum*, and the necroses with necrotic veins might be caused by application on leaves with trichothecenes produced by *M. verrucaria*. Therefore, we think that trichothecenes produced by *M. verrucaria* can be regarded as toxins.

Some toxins known to play a causal role in diseases have been termed pathotoxins. However, experimental proof that a toxin is involved in a particular disease is difficult to be found because a toxin might be present in very small amounts in diseased tissues and unstable through extraction and purification procedures. The demonstration that a compound produced in culture can cause disease symptoms is not in itself a conclusive evidence because the same compound is not necessarily produced *in vivo*. The suspected toxin must be isolated from the diseased host, purified, and re-introduced into plants to confirm whether the same symptoms reappear or not (Dickinson and Lucas, 1982). Therefore, we made *M. verrucaria* produce large amounts of phytotoxic substances on PSA medium, determined the chemical structures of them and then detected the phytotoxic substances from diseased mulberry leaves. After that, toxins produced on diseased mulberry leaves were identified and quantified. As results of our experiments, Frc 4, roridin A and verrucarins A might be pathotoxins but verrucarins J is not. These findings might support the hypothesis that several trichothecenes produced by *M. verrucaria* play an important role in development of the disease but there are some trichothecenes which are not pathotoxins always the trichothecenes produced by the fungus on an artificial medium.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. M. Sato, National Institute of Agrobiological Sciences for supplying plant seeds and Mr. K. Miyamoto and Ms. S. Wada for supporting these experiments.

## REFERENCES

- BEAN G. A., JARVIS B. B. & ABOUL-NASR M. B. (1992) A biological assay for the detection of *Myrothecium* spp. produced macrocyclic trichothecenes. *Mycopathologia*, 119: 175-180.

- BOHNER B. & TAMM CH. (1966) Die konstitution von roridin A. *Helv. Chim. Acta*, 49: 2527-2546.
- BOOTH C. (1971) Fungal culture media. In : *Methods in microbiology*, Vol.4 (Booth C.ed) pp.49-94, Academic Press., London.
- DICKINSON C. H. & LUCAS J. A. (1982) *Plant pathology and plant pathogens*. p. 229. Blackwell Scientific Pub. Victoria, Australia.
- FETZ E., BOHNER B. & TAMM CH. (1965) Die konstitution von verrucaridin J. *Helv. Chim. Acta*, 48: 1669-1679.
- GUTZWILLER J. & TAMM CH. (1965) Über die struktur von verrucaridin A. *Helv. Chim. Acta*, 48: 157-176.
- HARRI E., LOEFFLER W., SIGG H. P., STAHELIN H., STOLL Ch., TAMM CH. & WIESINGER D. (1962) Über die verrucaridine und roridine, eine gruppe von cytotatisch hochwirksamen antibiotica aus *Myrothecium*-Arten, *Helv. Chim. Acta*, 45: 839-853.
- HARRIS L. J., DESJARDINS A. E., PLATTNER R. D., NICHOLSON P., BUTLER G., YOUNG J. C., WESTON G., PROCTOR R. H. & HOHN T. M. (1999) Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Dis.*, 83: 954-960.
- JARVIS B. B., EPPL Y. R. M. & MAZZALA E. P. (1983) Chemistry and bioproduction of macrocyclic trichothecenes. In : *Trichothecenes—chemical, biological and toxicological aspects*. (Ueno, Y. ed) pp. 20-38, *Dev. Food Sci.*, New York.
- JARVIS B. B. & YATAWARA C. S. (1986) Roritoxins, new macrocyclic trichothecenes from *Myrothecium roridum*. *J. Org. Chem.*, 51: 2906-2910.
- KUTI J. O., NG T. J. & BEAN G. A. (1989) Possible involvement of a pathogen-produced trichothecene metabolite in *Myrothecium* leaf spot of muskmelon. *Phys. Mol. Plant Pathol.*, 34: 41-54.
- MURAKAMI R. & SHIRATA A. (1998) The toxic components produced by *Myrothecium roridum*, causal fungus of leaf spot of mulberry, and its influence on the pathogenicity. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 67: 57-64 (in Japanese with English summary).
- MURAKAMI R., MIYAMOTO K., MITSUHASHI W. & WADA S. (2004) Detection of mycotoxins produced by pathogen in *Myrothecium* leaf spot of mulberry. *Sericologia*, 44:127-137.
- MURAKAMI R., KOBAYASHI T. & TAKAHASHI K. (2005) *Myrothecium* leaf spot of mulberry caused by *Myrothecium verrucaria*. *JGPP*, 71: 153-155.
- PROCTOR R. H., HOHN T. M. & McCORMICK S. P. (1995) Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *MPMI*, 8: 595-601.
- YANG S-M. & JONG S. C. (1995a) Host range determination of *Myrothecium verrucaria* isolated from leafy spurge. *Plant Dis.*, 79: 994-997.
- YANG S-M. & JONG S. C. (1995b) Factors influencing pathogenicity of *Myrothecium verrucaria* isolated from *Euphorbia esula* on species of *Euphorbia*. *Plant Dis.*, 79: 998-1002.

**DETECTION ET IDENTIFICATION DE SUBSTANCES  
PHYTOTOXIQUES DANS LES FEUILLES DE MURIER  
INOCULEES AVEC *MYROTHECIUM VERRUCARIA*, UN  
PATHOGENE DE LA TACHE DE LA FEUILLE  
*MYROTHECIUM* DU MURIER**

**R. MURAKAMI<sup>1</sup>, S. HIRADATE<sup>2</sup>, A. SHIRATA<sup>3</sup> & W. MITSUHASHI<sup>1</sup>**

1. National Institute of Agrobiological Sciences, 1-2 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japon.

2. National Institute for Agro-Environmental Sciences, 3-1-3, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki  
305-8604, Japon

3. National Institute of Agrobiological Sciences, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602,  
Japon.

*Myrothecium verrucaria* est connu comme pathogène de la tache de la feuille *Myrothecium*. L'extrait de culture de *M. verrucaria* est phytotoxique pour de nombreuses espèces de plantes et augmente la formation de lésions provoquées par les conidies de *M. verrucaria* sur les plantes. On a isolé les verrucarines A et J, la roridine A de la culture comme des substances phytotoxiques. La substance phytotoxique la plus importante est la verrucarine J, suivie par la verrucarine A, la roridine A ; il y a aussi une production d'une petite quantité d'une toxine non identifiée. Chez les feuilles de mûrier inoculées avec *M. verrucaria* qui développent la maladie, on détecte la verrucarine A, la roridine A et une toxine non identifiée mais pas la verrucarine J. La verrucarine A, la roridine A et une toxine non identifiée pourraient donc jouer un rôle de pathotoxine dans la pathogénicité du champignon mais la verrucarine J ne semble pas être impliquée.

**INTRODUCTION**

Le champignon *Myrothecium verrucaria* (Alb. et Schweim.) Ditmar ex Fr. est connu comme un pathogène de la maladie de la tache de la feuille du mûrier *Myrothecium* (Murakami et coll., 2005) et comme producteur de mycotoxines appelées trichothécènes (Jarvis et coll., 1983 ; Jarvis et Yatawara, 1986). Les trichothécènes sont des époxydes sesquiterpénéïdes produits par les genres fongiques *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* et *Trichothecium* et sont des inhibiteurs puissants de la synthèse des protéines dans les cellules eukaryotiques (Jarvis et coll., 1983). Des auteurs variés ont déjà examiné le rôle des trichothécènes produits par plusieurs champignons pathogènes. On pense que la production de trichothécènes par *Fusarium* et *Myrothecium* contribue à leur virulence (Harris et coll., 1999 ; Kuti et coll., 1989 ; Murakami et coll., 2004 ; Proctor et coll., 1995). Cependant, il existe plusieurs souches de *Myrothecium* qui ne produisent pas de trichothécènes (Bean et coll., 1992) et on n'a pas encore étudié jusqu'à présent le rôle des trichothécènes dans la pathogénicité de *M. verrucaria*. Nous avons donc examiné dans cette étude si *M. verrucaria* produit ou non des trichothécènes et isolé des substances phytotoxiques à partir d'une culture de *M. verrucaria* et à partir de feuilles malades attaquées par le champignon.

## MATERIELS ET METHODES

### Champignon utilisé :

On a isolé la souche M95083 de *Myrothecium verrucaria* sur des feuilles de mûrier dans une mûraie de la Préfecture d'Akagi, au Japon (Murakami et coll., 2005) et on l'a cultivée sur un milieu agar de saccharose de pomme de terre (PSA : 2 % de saccharose et 1,8 % d'agar dans un bouillon de pomme de terre à 20 %) (Booth, 1971) à 25° C.

### Préparation des feuilles de mûrier :

On cultive le cultivar de mûrier " Shin ichinose " dans une mûraie du *National Institute of Agrobiological Sciences* (Tsukuba, Japon). On laboure le terrain pour lutter contre les mauvaises herbes et on s'assure que le sol est exempt de *M. verrucaria*. On récolte les feuilles de mûrier environ 30 cm au dessous des branches du haut et on les stérilise avec de l'éthanol à 70 %. On perce les feuilles avec un paquet de 10 aiguilles. On incube les feuilles traitées dans une boîte en plastique (22 × 30 × 6,5 cm) avec un papier filtre humidifié à 25 ± 1° C.

### Examen de la pathogénicité de *M. verrucaria* :

Trois inoculum : on a inoculé la suspension conidiale (C), l'extrait de culture (E) et le mélange de conidies et E (CE) de *M. verrucaria* sur les feuilles intactes ou les feuilles perforées de 90 cultivars de mûrier (Tableau I) et sur les feuilles intactes ou les feuilles perforées de 108 espèces appartenant à différentes familles de plantes (Tableau II). On recueille et on rince dans de l'eau stérilisée distillée (DSW) trois fois les conidies de la souche M95083 de *M. verrucaria* sur une culture PSA de deux semaines pour enlever les mycotoxines sécrétées par le champignon dans la culture (conidies rincées). On suspend les conidies rincées dans du DSW à 10<sup>7</sup> conidies / ml et on inocule 10 µl de la suspension dans la DSW comme inoculum C. On sèche les cultures de *M. verrucaria* de deux semaines (20 ml) et on extrait les composés de la culture avec 20 ml de DSW. Puis on filtre l'eau extraite (taille du pore : 0,22 µm ; Minisart, Sartorius, Gottingen, Allemagne) et on inocule 10 µl de l'extrait comme inoculum E. On suspend les conidies rincées dans E à 10<sup>7</sup> conidies / ml ; et on inocule 10 µl de suspension comme inoculum CE. On incube les feuilles traitées dans une boîte en plastique et on les examine sept jours après l'inoculation. On examine les taux d'infestation et les diamètres de la lésion provoquée par les inoculum C et CE et le pourcentage d'émergence de la nécrose et le diamètre des nécroses provoquées par l'inoculum E.

On calcule les écarts types moyens pour les pourcentages et les diamètres provoqués par chaque inoculum à partir des moyennes pour chaque cultivar de mûrier et pour chaque espèce de plante inoculée avec chaque inoculum. Pour l'examen des effets des substances phytotoxiques de l'inoculum E sur le développement de la lésion on procède à l'analyse ANOVA pour les moyennes des taux d'infestation et des diamètres des lésions entre l'inoculum C et l'inoculum CE sur les cultivars de mûrier (n = 90) et sur les différentes espèces de plantes (n = 108).

### Extraction et purification des substances phytotoxiques à partir de la culture PSA de *M. verrucaria* :

La méthode pour l'isolement des substances phytotoxiques produites par *M. verrucaria* est la méthode modifiée pour l'isolement des substances phytotoxiques produites par *M. roridum* (Murakami et coll., 2004). On incube la souche M95083 sur 2 000 ml de PSA dans 100 boîtes de petri (diam. 9 cm) à 25 ± 1° C pendant un mois. On sèche la culture, puis on extrait les composés de la culture avec 2000 ml de méthanol en les agitant à 60 tpm pendant 1 heure. On répète cette extraction trois fois. On fait évaporer l'extrait de méthanol. Puis, on dissout chacun des résidus dans 400 ml d'eau et d'acétate d'éthyle et on les agite. La couche soluble d'acétate d'éthyle s'évapore et on la dissout dans 500 µl de méthanol. On la soumet à une chromatographie liquide en phase normale (NPLC) en utilisant 24 g de Wakogel C-300 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japon) avec

une élution par étapes avec 120 ml de chacun des 8 éluants. On soumet les sous-fractions toxiques à une chromatographie liquide en phase inversée (RPCLC) en utilisant 5 g de Cosmosil 140 C<sub>18</sub>-OPN (Nacalai Tesque Industries, Kyoto, Japon) et on les élue par étapes avec 25 ml de méthanol aqueux. On soumet chaque sous-fraction toxique à l'HPLC (système LC 10A), Shimadzu Industries, Kyoto, Japon) avec une colonne ODS-II (Shimadzu-Techno Research Industries, Kyoto, Japon) en utilisant 60 % de méthanol aqueux et 20 % ou 30 % d'isopropanol aqueux (taux d'élution 1 ml / min) à 40° C et on détecte les fractions à une longueur d'ondes de 260 nm. La procédure de production, d'extraction et de purification des substances phytotoxiques produites par *M. verrucaria* est présentée dans la Figure 1.

Pour examiner l'existence de substances phytotoxiques dans les sous-fractions, chaque extrait qui en résulte est séché et dissout avec 0,1 % de méthanol. On dépose les solutions de fraction qui en résultent (20 µl, plus de 100 ppm) sur les parties perforées des feuilles de mûrier. Comme témoin, on dépose 20 µl de méthanol à 0,1 % sur des parties supplémentaires perforées sur les mêmes feuilles et on confirme que cela n'affecte pas les feuilles. On évalue l'activité toxique d'après le degré de nécrose sur la partie de la feuille sept jours après l'application.

#### Identification des substances phytotoxiques isolées :

On dissout les substances purifiées dans du chloroforme-d (Aldrich, Tokyo, Japon) contenant 0,2 % de tétraméthylsilane et on mesure la résonance magnétique nucléaire <sup>1</sup>H (NMR) et le spectre <sup>13</sup>C-NMR en utilisant un spectromètre ARS-400 (Bruker, Tokyo, Japon) ou un Système JNM alpha 600 FT-NMR (JEOL, Tokyo, Japon). On mesure les spectres en masse en utilisant un JMS-SX 102A ou un JNS SX 120A (JEOL) après la dissolution des échantillons dans de l'isobutane

#### Méthode de titrage biologique par chromatographie sur couche mince (TLC) :

La méthode pour la détection des substances phytotoxiques dans les feuilles de mûrier inoculées avec *M. verrucaria* est la méthode modifiée pour la détection des substances phytotoxiques produites par *M. roridum* (Murakami et coll., 2004). Pour identifier les substances phytotoxiques dans les feuilles malades inoculées avec *M. verrucaria*, on soumet les extraits des feuilles malades à la méthode de titrage biologique TLC (Murakami et Shirata, 1998).

On suspend les conidies rincées de la souche M95083 de *M. verrucaria* dans du DSW à 10<sup>6</sup> conidies / ml. On coupe les feuilles de mûrier (200 g) en morceaux (d'environ 1,5 × 1,5 cm) et on les trempe dans la suspension conidiale. Puis on incube les morceaux de feuille inoculés dans une boîte en plastique avec du papier filtre à 25 ± 1° C et on les échantillonne tous les deux jours pendant 14 jours. On sèche les feuilles échantillonnées à 80° C pendant 8 heures dans un four aéré (WFO-450ND, EYELA, Tokyo), on les pulvérise dans un broyeur (MCG-180, Matsubara, Osaka) pendant trois minutes et on les stocke dans un dessiccateur avec de l'anhydride phosphorique à 5° C. On trempe les feuilles pulvérisées dans 1500 ml de méthanol agité à 90 tpm pendant une heure et on répète cette extraction trois fois. On évapore l'extrait de méthanol et on le dissout dans 100 ml de méthanol. On dépose 40 micro litres de l'extrait de méthanol sur la plaque TLC (DC-Alufolien Keselgel 60 F254, Merk, Darmstadt, Allemagne), dans de l'éther dyéthylique en suivant la méthode de titrage biologique TLC (Murakami et Shirata, 1998). On vaporise les conidies de la souche fongique M9401, qui est sensible aux mycotoxines produites par *Myrothecium* (Murakami et Shirata, 1998) sur la plaque TLC pour détecter les mycotoxines dans les extraits. Puis, on incube la plaque dans une boîte en plastique avec du papier filtre humidifié à 25 ± 1° C.

#### Mesure de la concentration en substances phytotoxiques chez les feuilles malades :

La méthode pour la mesure de la concentration en substances phytotoxiques dans les feuilles de mûrier inoculées avec *M. verrucaria* est la méthode modifiée pour la détection des substances phytotoxiques produites par *M. roridum* (Murakami et coll., 2004). Pour déterminer la concentration en substances phytotoxiques dans les feuilles malades, on soumet les extraits de méthanol ci-dessus

provenant des feuilles malades à la procédure conçue dans la Figure 1. Cependant, il existe quelques différences entre les méthodes. La fraction RPLC ne donne pas de résultat parce que l'extrait provenant de la fraction NPLC est petit. Chaque fraction NPLC subtoxique (20 µl de 1000 ppm) et les substances purifiées sont soumises à l'HPLC avec une colonne ODS-II en utilisant 60 % de méthanol aqueux (taux d'élution 1 ml / min) à 40° C et on les détecte à une longueur d'onde de 260 nm pour mesurer la concentration en substances phytotoxiques. On identifie les substances dans les feuilles malades en comparant les temps de rétention de l'analyse HPLC avec ceux des substances purifiées et on calcule la concentration de chaque substance dans les feuilles malades sur la base de la surface maximum obtenue avec un intégrateur (C-R6A Chromatopac, Shimadzu).

## RESULTATS

### Phytotoxicité de *M. verrucaria* pour les plantes :

Les résultats concernant les pourcentages d'infestation, l'émergence des nécroses et l'émergence des lésions et leur diamètre chez les cultivars de mûrier et chez les autres plantes sont présentés dans les Figures 2 et 3. Les conidies de *M. verrucaria* n'infestent pas les feuilles de mûrier intactes (Fig. 2, en haut) mais infestent 8 % des feuilles de mûrier perforées des différents cultivars (diamètre de la lésion : 1,6 mm). L'inoculum E provoque des nécroses avec des nervures nécrotiques sur les feuilles intactes des cultivars de mûrier (taux d'infestation : 91 %, diamètre de la lésion : 8 mm) et sur les cultivars perforés (taux d'infestation : 100 %, diamètre de la lésion : 13 mm).

L'inoculum CE infeste toutes les feuilles intactes (diamètre de la lésion : 12 mm) et les feuilles perforées (diamètre de la lésion : 28 mm) (Fig. 3, en haut).

Pour 108 espèces de plantes, les conidies de *M. verrucaria* n'infestent pas les feuilles intactes (Fig. 2, en bas) mais infestent 1,9 % des feuilles perforées (diamètre de la lésion : 1 mm) (Fig. 3, en bas). L'inoculum E provoque des nécroses avec des nervures nécrotiques sur les feuilles de la plante (pourcentage d'émergence de la nécrose : 13,9 % et diamètre de la nécrose : 5 mm sur les plantes intactes, pourcentage d'émergence de la nécrose : 61,1 % et diamètre de la nécrose : 9 mm sur les plantes perforées) et on observe le taux d'infestation le plus élevé avec l'inoculation CE (taux d'infestation : 26,9 % et diamètre de la lésion : 11 mm sur les plantes intactes, taux d'infestation : 70,7 % et diamètre de la lésion : 25 mm sur les plantes perforées).

Il existe des différences significatives pour les moyennes de taux d'infestation et pour les moyennes des diamètres entre l'inoculum C et l'inoculum CE sur les feuilles intactes des cultivars de mûrier et sur les feuilles intactes des espèces de plantes ( $p < 0,001$ , avec l'ANOVA). De plus, il y a aussi des différences significatives entre les inoculum C et CE sur les feuilles de cultivars de mûrier perforées et sur les feuilles des espèces de plantes perforées ( $p < 0,001$ , avec l'ANOVA). Ces résultats suggèrent que les substances phytotoxiques existent dans l'extrait de culture et qu'elles entraînent une augmentation du diamètre de la lésion inoculée avec les conidies de *M. verrucaria*.

### Substances phytotoxiques produites sur le milieu PSA :

Les sous-fractions de (1) à (7) dans la Figure 1 présentent une toxicité pour les feuilles de mûrier ; on isole quatre espèces de substances phytotoxiques par HPLC. Les analyses NMR et de spectrométrie de masse de ces fractions révèlent que ces substances sont de la roridine A et les verrucarines A et J. On trouve la roridine A (Mm : 532) dans les sous-fractions (1) et (7) (Bohner et Tamm, 1966 ; Harri et coll. ; 1962 ; Jarvis et coll., 1983). On détecte la verrucarine A (Mm : 502) dans les sous-fractions (2) et (5) (Gutzwiller et Tamm, 1965 ; Jarvis et coll., 1983 ; Jarvis et Yatawara, 1986) et la verrucarine J (Mm : 500) est élue dans les sous-fractions (2) et (6) (Fetz et coll., 1965 ; Jarvis et coll., 1983 ; Jarvis et Yatawara, 1986). La roridine A et les verrucarines A et J appartiennent aux trichothécènes. On détecte la quatrième toxine (Frc 4) dans les sous-fractions (3) et (4) et la masse échantillonnée totale de ce composé est trop petite pour l'identifier, mais d'après les données du spectre NMR-<sup>1</sup>H, c'est probablement un trichothécène.

### Détection des substances phytotoxiques dans les feuilles malades par la méthode de titrage biologique TLC :

On incube les feuilles de mûrier inoculées avec les conidies de *M. verrucaria* pendant 0 à 14 jours et on soumet les extraits de méthanol des feuilles malades à la méthode de titrage biologique TLC (Fig 4). Parce que la souche fongique M9401 est sensible aux mycotoxines produites par *Myrothecium*, cela inhibe la croissance du champignon dans les zones où les mycotoxines se développent sur la plaque TLC. Ces zones ressemblent donc à des taches blanches. D'autre part, la couleur des zones où les mycotoxines ne se développent pas est noire. L'extrait des taches blanches sur TLC présentant une inhibition de la croissance de M9401 est toxique pour les feuilles de mûrier et les extraits autres que les taches ne présentent pas de toxicité. En conséquence, les composés seraient semblables à la verrucarine A ( $R_f$ : facteur de rétention = distance traversée par le composé / distance traversée par l'avant du solvant développé : 0,28), à la roridine A ( $R_f$ : 0,1) et Frc 4 ( $R_f$ : 0,17) par comparaison à la valeur  $R_f$  de la tache extraite des feuilles malades avec les valeurs  $R_f$  des substances phytotoxiques purifiées. On détecte la roridine A et Frc 4 après 6 jours de traitements et on détecte la verrucarine A après 10 jours mais on ne détecte pas la verrucarine J ( $R_f$ : 0,39).

### Concentrations en substances phytotoxiques dans les feuilles de mûrier :

La couleur des morceaux de feuille inoculés avec *M. verrucaria* est verte et elle commence à devenir marron à partir du bord des morceaux 4 jours après l'inoculation (Fig. 5, en haut). Au bout de 6 jours, des taches marron apparaissent à l'intérieur des morceaux, puis la couleur des zones marron devient noire et les hyphes du champignon croissent sur les morceaux au bout de 8 jours. Au bout de 10 jours, les conidies se forment sur les morceaux puis les zones nécrotiques se répandent sur tous les morceaux. Dans la Figure 1, seule la subfraction (3) des feuilles 2 jours après l'inoculation présente une toxicité pour les feuilles de mûrier et les sous-fractions de (1) à (3) des feuilles 14 jours après l'inoculation présentent une toxicité pour les feuilles. La fraction avec un temps de rétention de 6,9 min. par HPLC présente une toxicité pour les feuilles de mûrier et elle est identique à Frc4. On détecte Frc4 dans les feuilles malades du 2<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jour après l'inoculation. La concentration de Frc 4 est la plus élevée (10,5 ppm) au 12<sup>ème</sup> jour (Fig. 5, en bas). La fraction avec un temps de rétention de 9,9 min présente une toxicité pour les feuilles de mûrier et ce pic est identique à la verrucarine A. La concentration de la verrucarine A est la plus élevée (2 ppm) au 12<sup>ème</sup> jour. La fraction avec un temps de rétention de 11,9 min présente une toxicité pour les feuilles de mûrier et ce pic est identique à la roridine A. La concentration de la roridine A est la plus élevée (2,5 ppm) au bout du 12<sup>ème</sup> jour.

## DISCUSSION

On sait que *M. verrucaria* est un pathogène pour de nombreuses plantes (Yang et Jong, 1995a, 1995b) et un producteur de trichothécènes (Jarvis et coll., 1983 ; Jarvis et Yatawara, 1986). Cependant, on n'a pas étudié le mécanisme d'infestation de *M. verrucaria*. Dans cet article, l'extrait du milieu de culture de *M. verrucaria* entraîne des nécroses sur les plantes et augmente la formation de lésion provoquée par les conidies des champignons. On observe des tendances similaires avec *M. roridum*, un pathogène provoquant la tache de la feuille *Myrothecium*, une des maladies du mûrier (Murakami et Shirata, 1998). *M. roridum* produit aussi des trichothécènes et qui pourraient jouer certains rôles dans la pathogénicité du champignon (Murakami et coll., 2004).

De nombreux pathogènes qui poussent *in vitro* sécrètent des substances toxiques qui induisent certains ou tous les symptômes associés avec l'infestation par le pathogène sur les plantes hôtes. Parce que ces substances sont capables de perturber le métabolisme et ont de faibles poids moléculaires, on les décrit comme des toxines. Ces toxines sont très mobiles à l'intérieur des plantes. Elles fonctionneraient donc à distance du site réel de l'infestation (Dickinson et Luca, 1982). Les trichothécènes produits par *M. verrucaria* pourraient se déplacer dans la feuille le long des nervures comme les toxines produites par *M. roridum* et les nécroses avec les nervures nécrotiques pourraient

être provoquées par l'application sur les feuilles des trichothécènes produits par *M. verrucaria*. Nous pensons donc que l'on pourrait considérer les trichothécènes produits par *M. verrucaria* comme des toxines.

Certaines toxines censées jouer un rôle causal dans les maladies ont été appelées pathotoxines. Cependant, il est difficile de trouver la preuve expérimentale qu'une toxine est impliquée dans une maladie particulière parce qu'une toxine pourrait être présente en très petites quantités dans les tissus malades et instable avec les procédures d'extraction et de purification. La preuve qu'un composé produit par une culture peut provoquer des symptômes de maladie n'est pas en elle-même une preuve concluante parce que le même composé n'est pas nécessairement produit *in vivo*. La toxine suspectée doit être isolée de l'hôte malade, purifiée et réintroduite dans les plantes pour confirmer si les mêmes symptômes réapparaissent ou non (Dickinson et Lucas, 1982). Nous avons donc fait produire de grandes quantités de substances phytotoxiques à *M. verrucaria* sur un milieu PSA, déterminé leurs structures chimiques et puis détecté les substances phytotoxiques dans les feuilles de mûrier malades. Après cela, nous avons identifié et quantifié les toxines produites dans les feuilles de mûrier malades. Le résultat de nos expériences montre que Frc 4, la roridine A et la verrucarine A pourraient être des pathotoxines mais pas la verrucarine J. Ces résultats pourraient confirmer l'hypothèse selon laquelle plusieurs trichothécènes produits par *M. verrucaria* jouent un rôle important dans le développement de la maladie mais qu'il existe des trichothécènes qui ne sont pas toujours des pathotoxines, les trichothécènes produits par le champignon sur un milieu artificiel.

## STUDIES ON REELING - PART I. EFFECT OF COCOON COOKING CONDITION AND REELING BASIN WATER TEMPERATURE ON REELING PERFORMANCE OF INDIAN MULTIBIVOLTINE COCOONS

SUBHAS V. NAIK\* & T. H. SOMASHEKAR

Central Silk Technological Research Institute (CSRTI), Central Silk Board, BTM Layout,  
Madiwala, Bangalore – 560 068, India.

*Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on reeling characteristics has been studied for Indian multibivoltine cocoons. Cocoon cooking was carried out adopting single pan cooking and pressurised cooking method, whereas reeling basin water temperatures of 30° C, 40° C, 50° C and 70° C were maintained for the study. The reeling characteristics i.e. reelability, non broken filament length, raw silk percentage, and thread troubles during reeling have been found to be significantly influenced by both cocoon cooking condition and reeling basin water temperature. Single pan cooking method and low basin water temperature of 30° C affect the reelability, non broken filament length and raw silk percentage significantly. Whereas higher reeling basin water temperature of 60° C – 70° C increases the thread troubles and sericin dissolution during reeling. Results indicate that cooking of cocoons to the required level and maintaining reeling basin water temperature at 40° C – 50° C is essential for achieving better reeling performance.*

**Keywords:** Basin water temperature, cocoon cooking, reelability, raw silk %, thread troubles.

### INTRODUCTION

Reeling basin water temperature is an important parameter which is expected to influence the reeling performance. Studies have been conducted on the influence of reeling basin water temperature on reeling performance (Mino 1951, Subhas 2004) with reference to the bivoltine hybrid cocoons. Sao *et al.*, (1987) have studied the influence of cocoon cooking temperature and reeling basin water temperature on reeling performance.

In order to achieve better results, this type of study is also essential for Indian multibivoltine cocoons. Multibivoltine cocoons are generally less compact, loose in build with low shell content (Sonwalkar, 1992). This information is quite useful for Indian silk reeling industry. Therefore, the present study focuses on the influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on reeling characteristics of Indian multibivoltine cocoons.

### MATERIALS AND METHODS

---

\* Author to whom correspondence may be addressed.

**1. Raw material:**

Multibivoltine cocoons (PM × NB<sub>4</sub>D<sub>2</sub>) purchased from the Government. Cocoon markets were used for the studies.

**2. Experimental design:**

The experimental design varied cooking conditions (2 types i.e. open pan and pressurised cooking method and reeling basin water temperature (5 levels i.e. 30° C, 40° C, 50° C, 60° C and 70° C) for a two way analysis.

**3. Cocoon drying:**

Cocoons were hot air dried to the optimum level using a temperature profile of 115° C to 55° C for four and a half hours.

**4. Cocoon cooking:**

In case of single pan, cocoons were cooked using 93° - 95° C temperature for 2 minutes duration.

Pressurised cooking of cocoons was carried out using CSRTI pressurised circular cooking machine by employing the following cooking parameters.

|                                               | Temperature    | Duration    |
|-----------------------------------------------|----------------|-------------|
| a. Retting conditions                         | 70° C          | 45 seconds  |
| b. High temperature (steam) treatment         | 90° C          | 30 seconds  |
| c. Low temperature water permeation treatment | 75° C          | 60 seconds  |
| d. Cooking treatment                          | 95° C          | 30 seconds  |
| e. Adjustment treatment                       | 95° C to 75° C | 240 seconds |

**5. Brushing:**

Cooked cocoons were brushed at 80° C hot air water.

**6. Reeling:**

The cocoons were reeled on CSTRI multiend reeling machine adopting five different basin water temperatures with following parameters.

Reeling speed: 100 mtrs / min

Croissure length: 8 cms

Reeling basin water temperature: 30° C, 40° C, 50° C, 60° C and 70° C

CSRTI reeling buttons with 250 microns hole diameter

**7. Small reel permeation:**

Small reels are soaked in water using CSTRI small reel vacuum permeation chamber using vacuum pressure of 300 mm Hg. The cycle is repeated for three times.

**8. Re-reeling:**

Raw silk was re-reeled using CSRTI closed type re-reeling machine with re-reeling speed of 225 rpm, 40° C temperature and 45% RH in re-reeling machine.

#### **9. Water quality:**

Water having 7.1 pH, 70 ppm hardness and 80 ppm alkalinity was used for the study.

#### **10. Reeling data:**

Reeling characteristics i. e. reelability, average filament length, non-broken filament length, waste % on silk weight, raw silk % were calculated from the reeling results obtained during reeling of different combinations as per the design of experiment.

#### **11. Statistical analysis:**

The data collected were statistically analysed using a two-way analysis of variance.

### **RESULTS AND DISCUSSIONS**

The mean results of effect of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on reeling characteristics are presented in Table I and figures 1 to 5. The analysis of variance results of reeling characteristics are presented in Table II and III.

#### **Reelability and non-broken filament length:**

Reelability and non-broken filament length of cocoons are found to increase as the reeling basin water temperature increases from 30° C to 70° C (Figure 1 & 2). It is observed that (Figure 1 & 2) pressurised cooking method has given significantly better reelability and non-broken filament length of cocoons as compared to single open pan cooking method. Influence of cooking method and reeling basin water temperature on reelability and non-broken filament length of cocoons is statistically significant at 1 % level (Table II).

Better reelability and non-broken filament length in the case of pressurised cooking method is attributed to uniform swelling and softening of sericin of all the filament layers of cocoon shell to the required level as compared to under / uneven cooking of filament layers in the case of single pan method.

It is to be noted that after cooking the cocoons, sericin will be in softened and swollen condition. During reeling, if basin temperature is less, softened sericin will get solidified and hardened to a certain extent leading to an increase in the filament unwinding tension. Higher filament unwinding increases the cocoon droppings during reeling and hence reduces the reelability, whereas, high reeling basin water temperature reduces the agglutination force between the cocoon filament and cocoon shell and between the filament crossing points as reeling is progressed, thereby increasing the reelability.

#### **Raw silk percentage and waste percentage on silk weight:**

Figure 3 and Table I show that pressurised cooking method with 40° C basin water temperature has given better raw silk recovery and hence raw silk percentage as compared to any other conditions. It is observed (Table II) that influence of reeling basin water temperature and cooking methods on raw silk recovery, raw silk percentage and waste percentage on silk weight is statistically significant at 1% level.

Pressurised cooking method has given better raw silk recovery and raw silk percentage as compared to single pan method at all the levels of reeling basin water temperatures (Figure 3). This can be attributed to better cooking conditions of cocoons in case of pressurised cooking method, which has resulted in less waste percentage (Fig. 4). Even though sericin dissolution is more (Table I) during reeling in the case of pressurised cooking method as compared to single pan method, raw silk percentage is better than that of single pan cooking method due to significant reduction in waste percentage in the case of pressurised cooking method.

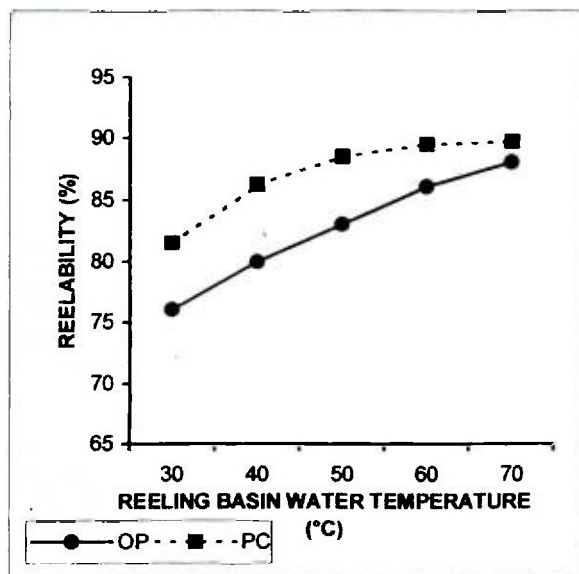


Fig. 1. Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on reelability of cocoons.

OP – Open pan cooking. PC – Pressurised cooking.

*Fig. 1. Influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la baignoire de dévidage sur la dévidabilité des cocons.*

OP – Cuisson à la baignoire ouverte. PC – Cuisson pressurisée.

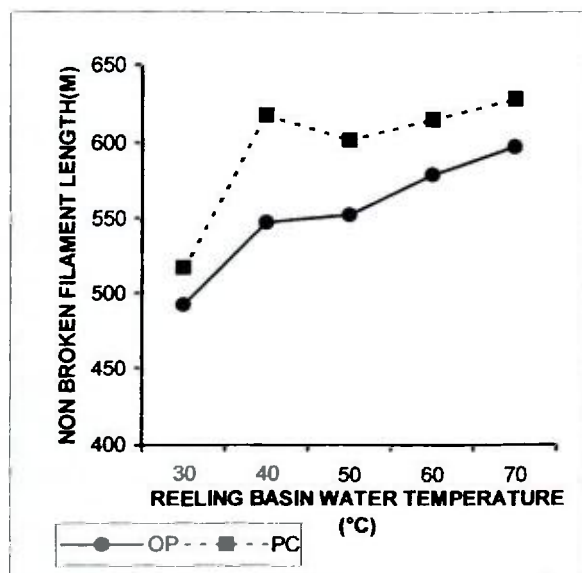


Fig. 2. Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on non-broken filament length of cocoons.

OP – Open pan cooking. PC – Pressurised cooking.

*Fig. 2. Influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la baignoire de dévidage sur la longueur du filament de cocon sans rupture.*

OP – Cuisson à la baignoire ouverte. PC – Cuisson pressurisée.

Results indicate that higher raw silk percentage in the case of 40° C reeling basin water temperature as compared to 30° C reeling basin water temperature is due to less waste % generation and pelade waste in the case of 40° C basin water temperature. Whereas higher raw silk % in the case

of 40° C reeling basin water temperature as compared to that of 50° C, 60° C & 70° C basin water temperature is due to less sericin dissolution during reeling at 40° C reeling basin water temperature. It is observed (Table I) that differences in degumming loss of raw silk between 30° C & 40° C, 40° C & 50° C; 50° C & 60° C and 50° C & 70° C are statistically significant at 5% level.

#### Thread troubles during reeling:

The results presented in Table III indicate that the influence of reeling basin water temperature on the thread troubles during reeling is significant at 1% level, whereas influence of cooking method and interaction effect of cooking method and reeling basin water temperature on thread troubles is significant at 5% level.

**Table I. Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on reeling performance.**

*Tableau I. Influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur la performance de dévidage.*

| Reeling basin water temperature                | Reelability (%)              |                     | Raw silk recovery (%)          |                     | Reeling tension (g/d)        |                     | Degumming loss of raw silk (%)        |                     |
|------------------------------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|
|                                                | Open pan Cooking             | Pressurised cooking | Open pan cooking               | Pressurised cooking | Open pan cooking             | Pressurised cooking | Open pan cooking                      | Pressurised cooking |
|                                                | Dévidabilité (%)             |                     | Récupération de soie grège (%) |                     | Tension de dévidage (g/d)    |                     | Perte de soie grège au décreusage (%) |                     |
|                                                | Cuisson à la bassine ouverte | Cuisson pressurisée | Cuisson à la bassine ouverte   | Cuisson pressurisée | Cuisson à la bassine ouverte | Cuisson pressurisée | Cuisson à la bassine ouverte          | Cuisson pressurisée |
| Température de l'eau de la bassine de dévidage |                              |                     |                                |                     |                              |                     |                                       |                     |
| 30° C                                          | 76                           | 81.5                | 58.91                          | 62.56               | 0.482                        | 0.462               | 24.81                                 | 24.42               |
| 40° C                                          | 79.9                         | 86.2                | 62.43                          | 65.77               | 0.437                        | 0.405               | 24.56                                 | 23.63               |
| 50° C                                          | 83                           | 88.45               | 60.05                          | 63.48               | 0.369                        | 0.323               | 23.86                                 | 23.39               |
| 60° C                                          | 86.05                        | 89.45               | 60.24                          | 63.78               | 0.299                        | 0.242               | 23.39                                 | 22.91               |
| 70° C                                          | 88                           | 89.65               | 60.93                          | 64.22               | 0.281                        | 0.206               | 23.1                                  | 22.52               |
| CD (P ≤ 0.5) for cooking method (A)            | 0.494                        |                     | 0.513                          |                     | 0.0067                       |                     | 0.04                                  |                     |
| CD (P ≤ 0.5) pour la méthode de cuisson (A)    |                              |                     |                                |                     |                              |                     |                                       |                     |
| Basin water temperature (B)                    | 0.781                        |                     | 0.812                          |                     | 0.0106                       |                     | 0.063                                 |                     |
| Température de l'eau de la bassine (B)         |                              |                     |                                |                     |                              |                     |                                       |                     |
| A × B                                          | 1.105                        |                     | 1.148                          |                     | 0.0149                       |                     | 0.089                                 |                     |

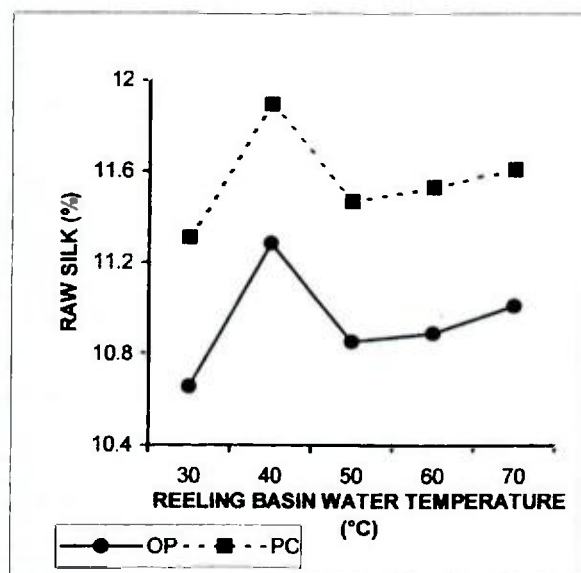


**Fig. 3. Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on raw silk %.**

OP – Open pan cooking. PC – Pressurised cooking.

*Fig. 3. Influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur le % de soie grège.*

OP – Cuisson à la bassine ouverte. PC – Cuisson pressurisée.

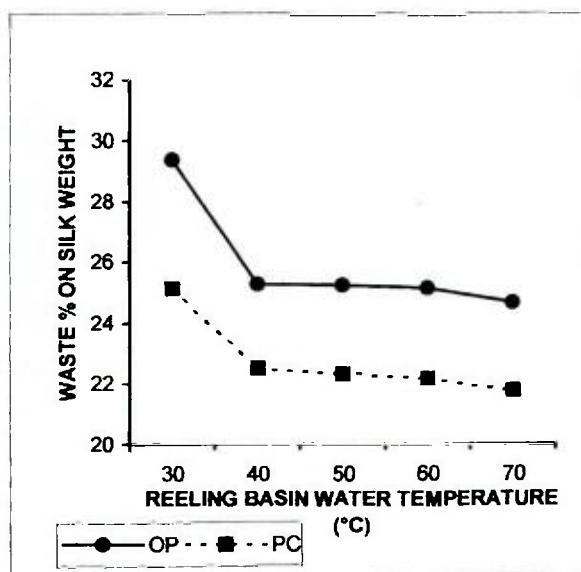


**Fig. 4. Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on waste %.**

OP – Open pan cooking. PC – Pressurised cooking.

*Fig. 4. Influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur le % de déchets.*

OP – Cuisson à la bassine ouverte. PC – Cuisson pressurisée.

**Table II. Analysis of variance of reeling performance results.****Tableau II. Analyse de variance pour les résultats de la performance de dévidage.**

| Factors                                                       | Mean sum of squares |              |                                   |                           |                            |                                              |
|---------------------------------------------------------------|---------------------|--------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------------------------|
|                                                               | Degree of freedom   | Reelability  | Non-broken filament               | Raw silk percentage       | Raw silk recovery          | Waste % on silk weight                       |
| Moyenne de la somme des carrés                                |                     |              |                                   |                           |                            |                                              |
| Facteurs                                                      | Degrés de liberté   | Dévidabilité | Longueur du filament sans rupture | Pourcentage de soie grège | Récupération de soie grège | % de déchets par rapport au poids de la soie |
| Cooking methods (A)<br><i>Méthodes de cuisson (A)</i>         | 1                   | 99.458**     | 9116.450**                        | 1.947**                   | 59.582**                   | 48.267**                                     |
| Basin temperature (B)<br><i>Température de la bassine (B)</i> | 4                   | 65.422**     | 6938.175**                        | 0.2**                     | 6.112**                    | 10.741**                                     |
| A × B                                                         | 4                   | 3.617**      | 324.325**                         | 0.011 <sup>NS</sup>       | 0.022NS                    | 0.383                                        |
| Error / <i>Ecart</i>                                          | 10                  | 0.246        | 33.850                            | 0.009                     | 0.265                      | 0.223                                        |

\*\* Significant at 1% level / *Significatif au seuil de 1 %*. \* Significant at 5% level / *Significatif au seuil de 5 %*. NS : Non significant / *Non significatif*.

It is observed from the Figure 5 that, 40° C reeling basin water temperature has given minimum thread troubles. Reeling thread troubles have been found to increase significantly as the reeling basin water temperature increases. This may be attributed to over softening of weak cross over points, when the reeling is done at high basin water temperature. Over softening of weak cross over points generate more number of slugs and hence increases the thread troubles.

Pressurised cooking method has given less number of thread troubles at low basin water temperature and this can be attributed to uniform swelling and softening of sericin of filament crossover points in the cocoon shell. Whereas thread troubles are found to be on the higher side when the basin water temperature is on the higher side in the case of both single pan and pressurised cooking methods and this may be attributed to over softening of some of the weak cross over points during reeling.

#### **Reeling tension (g/d):**

It is observed (Table I and III) that as the reeling basin water temperature increases, reeling tension decreases significantly. This is due to the fact that higher basin water temperature reduces the cocoon filament (dissociation) unwinding tension leading to decreased reeling tension.

Results show that pressurised cooking method has given significantly less reeling tension as compared to open pan cooking method (Table I). This can be attributed to better swelling and softening of sericin of cocoon filament cross points leading to reduction in filament exfoliation / unwinding tension.

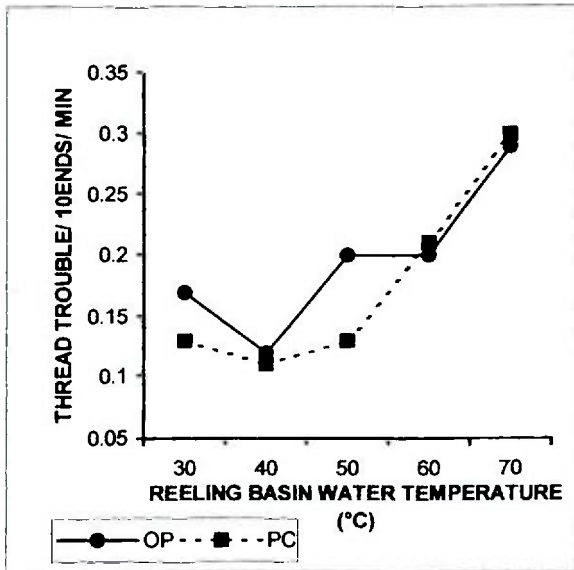


Fig. 5. Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on thread troubles during reeling.

OP – Open pan cooking. PC – Pressurised cooking.

Fig. 5. Influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur les problèmes avec le fil pendant le dévidage.

OP – Cuisson à la bassine ouverte. PC – Cuisson pressurisée.

Table III. Analysis of variance of reeling performance results.

Tableau III. Résultats de l'analyse de variance pour la performance de dévidage.

| Factors                                                | Mean sum of squares |                  |                               |                                       |
|--------------------------------------------------------|---------------------|------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
|                                                        | Degree of freedom   | Thread troubles  | Reeling tension (gms / den)   | Degumming loss (%) of raw silk        |
| Moyenne de la somme des carrés                         |                     |                  |                               |                                       |
| Facteurs                                               | Degrés de liberté   | Problèmes de fil | Tension de dévidage (g / den) | Perte de soie grège au décreusage (%) |
| Cooking methods (A)<br>Méthodes de cuisson (A)         | 1                   | 0.002*           | 0.011**                       | 1.625**                               |
| Basin temperature (B)<br>Température de la bassine (B) | 4                   | 0.019**          | 0.038**                       | 2.085**                               |
| A × B                                                  | 4                   | 0.001*           | 0**                           | 0.045**                               |
| Error / Ecart                                          | 10                  | 0.000            | 0.000                         | 0.002                                 |

\*\* Significant at 1% level / Significatif au seuil de 1 %. \* Significant at 5% level / Significatif au seuil de 5 %.  
NS : Non significant / Non significatif.

### **Degumming loss of raw silk:**

Results presented in Table I indicate that as the reeling basin water temperature increases degumming loss of raw silk decreases. This is due to the fact that sericin dissolution during reeling is more in the case of higher basin water temperature as compared to low basin water temperature leading to reduced degumming loss of raw silk (in case of higher basin water temperature).

It is observed (Table III) that influence cooking method, reeling basin water temperature and interaction effect of cooking method and reeling basin water temperature on degumming loss % of raw silk is statistically significant at 1% level.

## **CONCLUSION**

Cocoon cooking conditions and reeling basin water temperature have a direct bearing on reeling characteristics. The cocoon cooking condition significantly influences the swelling and softening degree of sericin and uniformity in softening of sericin of all the filament layers of cocoon shell, whereas the reeling basin water temperature plays a significant role in maintaining this swollen and softened condition of sericin during reeling. If the reeling basin water temperature is too low, it reduces the reelability, whereas very high reeling basin water temperature increases the thread troubles and sericin dissolution during reeling and hence reduces the raw silk yield. Results indicate that reeling basin water temperature has to be selected on the basis of cocoon quality and cocoon cooking conditions.

From the results and discussions, it can be concluded that 40° C - 50° C reeling basin temperature associated with good cooking is required for achieving better reeling performance from multibivoltine cocoons.

## **REFERENCES**

- HOSHINO (1957) "Reeling basin temperature and hydrogen ion concentrations and reeling results" Summary of silk reeling research report, Japan silk association, no. 7, 203-207.
- SUBHAS V. NAIK (2004) Studies on bivoltine cocoon reeling. Part I: Effect of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on reeling performance of Indian bivoltine hybrid cocoons. The Japanese society of silk science and technology, Vol. 13, 35-41.
- SAO (1987) Study on reeling basin temperature and reeling results. Research Report Gumma prefecture cocoon testing house, 42-67.
- SONWALKAR T. N. (1992) "Review of research work in post-cocoon harvest technology in India" *Sericologia* 32(1), 1-26.

## **ETUDES SUR LE DEVIDAGE - PREMIERE PARTIE. EFFET DES CONDITIONS DE CUISSON ET DE LA TEMPERATURE DE L'EAU DE LA BASSINE DE DEVIDAGE SUR LA PERFORMANCE DE DEVIDAGE DES COCONS POLYBIVOLTINS INDIENS**

**SUBHAS V. NAIK\* & T. H. SOMASHEKAR**

Central Silk Technological Research Institute (CSRTI), Central Silk Board, BTM Layout,  
Madiwala, Bangalore – 560 068, Inde.

*Nous avons étudié l'influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur les caractéristiques de dévidage des cocons polybivoltins indiens. On procède à la cuisson des cocons dans une bassine unique et par cuisson pressurisée ; on maintient les températures de l'eau de la bassine de dévidage à 30° C, 40° C, 50° C et 70° C. On constate que les caractéristiques de dévidage c'est à dire la dévidabilité, la longueur du filament sans rupture, le pourcentage de soie grège et les problèmes de fil pendant le dévidage sont considérablement influencés à la fois par les conditions de cuisson du cocon et la température de l'eau de la bassine de dévidage. La méthode de cuisson à une bassine unique et la faible température de l'eau de la bassine de 30° C affectent considérablement la dévidabilité, la longueur du filament sans rupture et le pourcentage de soie grège. Tandis qu'une température de l'eau de la bassine de dévidage plus élevée de 60° C - 70° C augmente les problèmes de fil et la dissolution de la sérécine pendant le dévidage. Les résultats indiquent que la cuisson des cocons au niveau requis et le maintien de la température de l'eau de la bassine de dévidage à 40° C - 50° C sont essentiels pour obtenir une meilleure performance de dévidage.*

### **INTRODUCTION**

La température de l'eau de la bassine de dévidage est un paramètre important qui est supposé influencer la performance de dévidage. Des études ont été réalisées sur l'influence de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur la performance de dévidage (Mino, 1951 ; Subhas, 2004) chez les cocons hybrides bivoltins. Sao et coll., (1987) ont étudié l'influence de la température de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur la performance de dévidage.

Pour obtenir les meilleurs résultats, ce type d'étude est aussi essentiel chez les cocons polybivoltins indiens. Les cocons polybivoltins sont en général moins compacts avec une structure relâchée et une faible teneur en coque (Sonwalkar, 1992). Ces informations sont très utiles pour l'industrie indienne de dévidage de la soie. Cette étude se penche donc sur l'influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur les caractéristiques de dévidage des cocons polybivoltins indiens.

---

\* Auteur auquel adresser la correspondance.

## MATERIELS ET METHODES

### 1. Matière première :

Pour l'étude, on a recours à des cocons polybivoltins (PM × NB4D2) achetés auprès du Gouvernement dans des marchés aux cocons.

### 2. Conception expérimentale :

La conception expérimentale fait varier les conditions de cuisson (2 types, c'est à dire méthode de cuisson ouverte à la bassine et pressurisée) et de la température de l'eau de la bassine de dévidage (5 niveaux c'est à dire 30° C, 40° C, 50° C et 70° C) pour une analyse à deux facteurs.

### 3. Séchage des cocons :

On sèche les cocons à l'air chaud au niveau optimum en utilisant un profil de température de 115° C à 55° C pendant quatre heures et demi.

### 4. Cuisson des cocons :

Quand on utilise une bassine unique, on cuit les cocons en utilisant une température de 93° - 95° C pendant une durée de 2 minutes. On procède à la cuisson pressurisée des cocons en utilisant une machine de cuisson circulaire pressurisée en utilisant les paramètres de cuisson suivants.

|                                                   | Température   | Durée        |
|---------------------------------------------------|---------------|--------------|
| a. Conditions de rouissage                        | 70° C         | 45 secondes  |
| b. Traitement à température élevée (vapeur)       | 90° C         | 30 secondes  |
| c. Traitement d'imprégnation à faible température | 75° C         | 60 secondes  |
| d. Traitement de cuisson                          | 95° C         | 30 secondes  |
| e. Traitement d'ajustement                        | 95° C à 75° C | 240 secondes |

### 5. Purgeage :

On purge les cocons cuits avec une eau chaude à 80° C.

### 6. Dévidage :

On dévide les cocons sur une machine de dévidage multibouts du CSRTI en adoptant cinq températures différentes pour l'eau de la bassine avec les paramètres suivants.

Vitesse de dévidage : 100 m / min

Longueur de croisure : 8 cm

Température de l'eau de la bassine de dévidage : 30° C, 40° C, 50° C, 60° C et 70° C

Des filières de dévidage du CSRTI avec un trou d'un diamètre de 250 microns.

### 7. Imprégnation avec un petit dévidoir :

On plonge les petits dévidoirs dans l'eau en utilisant une chambre d'imprégnation à vide du CSRTI pour petit dévidage avec une pression de vide de 300 mm Hg. On répète le cycle trois fois.

#### **8. Reflottage :**

On reflotte la soie grège en utilisant une machine de reflottage du CSRTI de type fermé avec une vitesse de reflottage de 225 tpm, une température de 40° C et une HR de 45 % dans la machine de reflottage.

#### **9. Qualité de l'eau :**

On utilise de l'eau avec un pH de 7,1 une dureté de 70 ppm et une alcalinité de 80 ppm pour l'étude.

#### **10. Données de dévidage :**

On procède aux calculs concernant les caractéristiques de dévidage, c'est à dire la dévidabilité, la longueur moyenne du filament, la longueur du filament sans rupture, le % de déchets par rapport au poids de la soie, le % de soie grège en fonction des résultats de dévidage obtenus pendant le dévidage des différentes combinaisons d'après la conception de l'expérience.

#### **11. Analyse statistique :**

On analyse les données recueillies de manière statistique en utilisant une analyse de variance à deux facteurs.

### **RESULTATS ET DISCUSSION**

Les résultats moyens concernant l'effet des conditions de cuisson et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sont présentés dans le Tableau I et les figures 1 à 5. Les résultats concernant l'analyse de variance pour les caractéristiques de dévidage sont présentés dans les Tableaux II et III.

#### **Dévidabilité et longueur du filament sans rupture :**

On constate que la dévidabilité et la longueur du filament sans rupture de cocons augmentent lorsque la température de l'eau de la bassine de dévidage augmente de 30 à 70° C (Figures 1 & 2). On observe (Figure 1 & 2) que la méthode de cuisson pressurisée donne une dévidabilité et une longueur de filament sans rupture des cocons considérablement meilleures par comparaison à la méthode de cuisson à une bassine. L'influence de la méthode de cuisson et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur la dévidabilité et la longueur du filament sans rupture est statistiquement significative au seuil de 1 % (Tableau II).

On attribue les meilleures dévidabilité et longueur de filament sans rupture dans le cas de la méthode de cuisson pressurisée au gonflement et au ramollissement uniformes de la sérécine au niveau requis dans toutes les couches de la coque soyeuse par comparaison à la sous cuisson ou à la mauvaise cuisson des couches dans le cas de la méthode avec une bassine unique.

On constate qu'après la cuisson des cocons, la sérécine se trouve amollie et gonflée. Pendant le dévidage, si la température de la bassine est inférieure, la sérécine ramollie se solidifiera et se durcira à un certain degré en entraînant une augmentation de la tension de dévidage du filament. Un déroulement plus important du filament augmente les cassures pendant le dévidage et diminue donc la dévidabilité, tandis qu'une température élevée de l'eau de la bassine de dévidage diminue la force d'agglutination entre le filament du cocon et la coque soyeuse et entre les points de croisement au cours du dévidage, ce qui augmente par là même la dévidabilité.

#### **Pourcentage de soie grège et pourcentage de déchets par rapport au poids de la soie :**

La figure 3 et le Tableau I montrent que la méthode de cuisson pressurisée avec une température de l'eau de la bassine à 40° C donne une récupération de soie grège et donc un pourcentage de soie grège meilleurs par comparaison aux autres conditions. On observe (Tableau II) que l'influence de la température de l'eau de la bassine de dévidage et des méthodes de cuisson sur la récupération de

soie grège, le pourcentage de soie grège et le pourcentage de déchets par rapport au poids de la soie est statistiquement significative au seuil de 1 %.

La méthode de cuisson pressurisée donne une récupération de soie grège et un pourcentage de soie grège meilleurs par comparaison à la méthode de cuisson dans une bassine à tous les niveaux de température de l'eau de la bassine de dévidage (Figure 3). On peut attribuer cela aux meilleures conditions de cuisson des cocons avec la méthode de cuisson pressurisée, qui donne moins de déchets (Fig. 4). Bien que la dissolution de la sérécine soit plus importante (Tableau I) pendant le dévidage avec la méthode de cuisson pressurisée par comparaison à la méthode avec une bassine, le pourcentage de soie grège est meilleur qu'avec la méthode de cuisson avec une bassine en raison de la diminution importante du pourcentage de déchets avec la cuisson pressurisée.

Les résultats indiquent que le pourcentage de soie grège plus élevé avec une température de l'eau de la bassine de dévidage de 40° C par comparaison à la température de l'eau de la bassine de dévidage de 30° C est dû au pourcentage inférieur de déchets et de pélette avec la température de l'eau de la bassine de 40° C. Tandis que le % de soie grège plus élevé avec la température de l'eau de la bassine de dévidage à 40° C par comparaison à une température de l'eau de la bassine de 50° C, 60° C et de 70° C est dû à une dissolution moins importante de la sérécine pendant le dévidage avec une température de l'eau de la bassine de dévidage de 40° C. On observe (Tableau I) que les différences de perte au décreusage de la soie grège entre 30° C et 40° C, 40° C et 50° C ; 50° et 60° C et 50° C et 70° C sont significatives sur le plan statistique au seuil de 5 %.

#### **Problèmes de fil pendant le dévidage :**

Les résultats présentés dans le Tableau III indiquent que l'influence de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur les problèmes de fil pendant le dévidage est significative au seuil de 1 %, tandis que l'influence de la méthode de cuisson et que l'effet d'interaction entre la méthode de cuisson et la température de l'eau de la bassine de dévidage sur les problèmes de fil sont significatifs au seuil de 5 %.

On observe d'après la Figure 5, que la température de l'eau de la bassine de dévidage de 40° C donne des problèmes minimum de fil. On constate que les problèmes de dévidage du fil augmentent considérablement lorsque la température de l'eau de la bassine de dévidage augmente. On peut attribuer cela au trop grand ramollissement des points de croisement faibles, quand on procède au dévidage à une température élevée de l'eau de la bassine. Le trop grand ramollissement des points de croisement faibles génère plus de bouchons et augmente donc les problèmes de fil.

La méthode de cuisson pressurisée donne moins de problèmes de fil avec une faible température de l'eau de la bassine et on peut attribuer cela au gonflement et au ramollissement uniformes de la sérécine dans les points de croisement du filament de la coque soyeuse. Tandis que les problèmes de fil s'avèrent plus importants quand la température de l'eau de la bassine est plus élevée à la fois avec la cuisson dans une bassine unique et avec la cuisson pressurisée et il se pourrait que cela soit dû au trop grand ramollissement de certains des points de croisement au cours du dévidage.

#### **Tension de dévidage (g / d) :**

On observe (Tableaux I et II) qu'alors que la température de l'eau de la bassine augmente, la tension de dévidage baisse considérablement. Cela est dû au fait que la température plus élevée de l'eau de la bassine diminue la tension de dévidage du filament de cocon (dissociation), ce qui entraîne une baisse de la tension de dévidage.

Les résultats montrent que la méthode de cuisson pressurisée donne considérablement moins de tension de dévidage par comparaison à la méthode de cuisson ouverte à la bassine (Tableau I). On peut attribuer cela aux meilleurs gonflement et amollissement de la sérécine dans les points de croisement du filament de cocon, ce qui entraîne une diminution de la tension d'exfoliation / de dévidage du filament.

**Perte de soie grège au décreusage:**

Les résultats présentés dans le Tableau I montrent qu'alors que la température de l'eau de la bassine augmente la perte au décreusage de la soie grège diminue. Cela est dû au fait que la dissolution de la sérécine pendant le dévidage est plus importante avec une température plus élevée de l'eau de la bassine, ce qui entraîne une baisse de la perte de soie grège au décreusage.

On observe (Tableau III) que l'influence de la méthode de cuisson, de la température de l'eau de la bassine de dévidage et de l'effet d'interaction entre la méthode de cuisson et la température de l'eau de la bassine de dévidage est significative sur le plan statistique au seuil de 1% sur le % de perte au décreusage de la soie grège

## CONCLUSION

Les conditions de cuisson du cocon et la température de l'eau de la bassine de dévidage ont un effet direct sur les caractéristiques de dévidage. Les conditions de cuisson du cocon influencent considérablement le degré de gonflement et d'amollissement de la sérécine et l'uniformité de l'amollissement de la sérécine dans toutes les couches du filament de la coque soyeuse, tandis que la température de l'eau de la bassine de dévidage joue un rôle important dans le maintien de cette condition de gonflement et de ramollissement de la sérécine au cours du dévidage. Si la température de l'eau de la bassine de dévidage est trop basse, cela diminue la dévidabilité, tandis que la température très élevée de l'eau de la bassine de dévidage augmente les problèmes de fil et la dissolution de la sérécine au cours du dévidage et diminue donc le rendement en soie grège. Les résultats indiquent que la température de l'eau de la bassine de dévidage doit être sélectionnée en fonction de la qualité des cocons et des conditions de cuisson des cocons.

D'après les résultats et les discussions, nous pouvons conclure qu'une température de l'eau de la bassine de dévidage de 40° C - 50° C associée à une bonne cuisson est nécessaire pour obtenir une bonne performance de dévidage avec les cocons polybivoltins.

## **STUDIES ON REELING - PART II. : EFFECT OF COCOON COOKING CONDITION AND REELING BASIN WATER TEMPERATURE ON QUALITY CHARACTERISTICS OF RAW SILK OF INDIAN MULTIBIVOLTINE COCOONS**

**SUBHAS V. NAIK\* & T. H. SOMASHEKAR**

Central Silk Technological Research Institute (CSRTI), Central Silk Board, BTM Layout,  
Madiwala, Bangalore -560 068, India.

*Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on quality characteristics of raw silk has been studied for Indian multibivoltine cocoons. Cocoon cooking was carried out adopting single pan cooking and pressurised cooking method, whereas reeling basin water temperatures of 30°C, 40°C, 50°C, 60°C and 70°C were maintained for the study. The quality characteristics of raw silk i.e. neatness, cleanness, tenacity, elongation and cohesion of raw silk have been found to be significantly influenced by both cocoon cooking condition and reeling basin water temperature. Pressurised cooking method associated with 40°C reeling basin water temperature has given better quality characteristics of raw silk as compared to other conditions. Single pan cooking method and low basin water temperature of 30°C affect the neatness, cleanness, elongation and cohesion of raw silk significantly. Higher basin water temperature of 60°C–70°C also affect the cleanness, elongation and cohesion of raw silk significantly. Results indicate that cooking of cocoons to the required level and maintaining the reeling basin water temperature at 40°C–50°C is essential for achieving better quality characteristics of raw silk.*

**Keywords:** Basin water temperature, cocoon cooking, reelability, raw silk %, thread troubles.

### **INTRODUCTION**

Reeling basin water temperature is one of the important reeling process parameters. Literature reveals that reeling basin water temperature varied depending on cocoons quality and cocoon cooking condition (Kojima, 1985). Studies have been conducted on the influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on quality characteristics of raw silk with reference to the bivoltine hybrid cocoons (Hoshino 1957, Konno 1962, Subhas 2004). In order to achieve better results, this type of study is also essential for Indian multibivoltine cocoons. Multibivoltine cocoons are generally less compact, loose in build with low shell content (Sonwalkar, 1992). The information in this regard is scanty. This information is quite useful for Indian silk reeling industry. Therefore, present work has been taken up to investigate the influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on quality characteristics of raw silk of Indian multibivoltine cocoons.

### **MATERIALS AND METHODS**

#### **1. Raw material:**

---

\* Author to whom correspondence may be addressed.

Multibivoltine cocoons (PM × NB4D2) purchased from the Government cocoon markets were used for the studies.

## 2. Experimental design:

The experimental design varied cooking conditions (2 type i. e. open pan and pressurised cooking method and reeling basin water temperature (5 levels i.e. 30° C, 40° C, 50° C, 60° C and 70° C) for a two way analysis.

## 3. Cocoon drying:

Cocoons were hot air dried to the optimum level using a temperature profile of 115° C to 55° C for four and a half hours.

## 4. Cocoon cooking:

In case of single pan, cocoons were cooked using 93° C - 95° C temperature for 2 minutes duration.

Pressurised cooking of cocoons was carried out using CSRTRI pressurised circular cooking machine by employing the following cooking parameters.

|                                         | Temperature    | Duration    |
|-----------------------------------------|----------------|-------------|
| a. Retting conditions                   | 70° C          | 45 seconds  |
| b. High temperature (steam) treatment   | 90° C          | 30 seconds  |
| c. Low temp. water permeation treatment | 75° C          | 60 seconds  |
| d. Cooking treatment                    | 95° C          | 30 seconds  |
| e. Adjustment treatment                 | 95° C to 75° C | 240 seconds |

## 5. Brushing:

Cooked cocoons were brushed at 80° C hot water.

## 6. Reeling:

The cocoons were reeled on CSTRI Multiend reeling machine adopting five different basin water temperatures with following parameters

Reeling speed : 100 mtrs / min

Croissure length : 8 cms

Reeling basin water temperature: 30° C, 40° C, 50° C, 60° C and 70° C

CSTRI reeling buttons with 250 microns hole diameter

## 7. Small reel permeation:

Small reels are soaked in water using CSTRI small reel vacuum permeation chamber using vacuum pressure of 300 mm Hg. The cycle is repeated for three times.

## 8. Re-reeling:

Raw silk was re-reeled using CSTRI closed type re-reeling machine with re-reeling speed of 225 rpm, 40° C temperature and 45% RH in re-reeling machine.

### **9. Water quality:**

Water having 7.1 pH, 70 ppm hardness and 80 ppm alkalinity was used for the study.

### **10. Raw silk testing:**

The raw silk samples were tested for neatness, cleanness characteristics using Seriplane tester and Cohesion character using Duplan Cohesion tester adopting ISA procedure. Further, tenacity and elongation of raw silk were tested using Instron tensile tester (model 5500) following standard procedure.

### **11. Statistical analysis:**

The data collected were statistically analysed using two-way analysis of variance

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The mean results of effect of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on quality characteristics of raw silk are presented in Table I and Figures 1 to 6. The analysis of variance results are given in Table II.

### **Neatness and low neatness %:**

Results indicate that cocoon cooking method and reeling basin water temperature have a significant (at 1% level) influence on neatness of raw silk (Figure 1 and Table II), whereas influence of these parameters on low neatness of raw silk is insignificant (Figure 2 and Table II). It is observed (Figure 1) that pressurised cooking method with 40° C reeling basin water temperature has given better neatness of raw silk as compared to other conditions. This is attributed to better and uniform swelling and softening of sericin of filament cross over points in all the layers of cocoon shell.

Neatness of raw silk is found to decrease as the reeling basin water temperature increases. This is due to the fact that at higher reeling basin water temperature, some of the filament cross over points will be over softened and unwound without straightening during reeling leading to the formation of neatness defects such as small loops and nibs etc in the thread.

CD values given in the Table I show that differences in neatness of raw silk between 30° C & 40° C; 40° & 50° C and 40° C & 70° C reeling basin water temperatures are significant at 5 % level.

### **Cleanness of raw silk:**

Table II shows that influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on cleanness of raw silk is significant at 1 %. From the figure 3, it is seen pressurised cooking method associated with 40° C reeling basin water temperature has given better cleanness of raw silk. It is observed that (Figure 3) that cleanness of raw silk increases from 30° C basin water temperature to 40° C basin water temperature and then decreases as the basin water temperature increases.

CD values (Table I) indicate that differences in cleanness of raw silk between 40° C and 30° C, 40° C and 60° C and 40° C and 70° C are significant at 5% level. Reduction in cleanness of raw silk at 30° C reeling basin water temperature as compared to that at 40° C reeling basin water temperature may be due to the fact that swollen and softened sericin will be hardened at low basin water temperature of 30° C and this may lead to generation of more loops particularly from the hard agglutinated cross over points.

Reduction in cleanness of raw silk at higher basin water temperature is due to the fact that, at higher basin water temperature swollen and softened sericin of some of filament cross over (probably weakly agglutinated) points will get over softened during the process of reeling (particularly during reeling of inside layers of cocoon shell) leading to generation of more slugs / waste defects in the raw silk. Because of these defects, cleanness of raw silk will get affected significantly.

**Table I. Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on quality characteristics of raw silk.**

*Tableau I. Influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur les caractéristiques de qualité de la soie grège.*

| Basin water temperature                      | Cleanness (%)                |                     | Tenacity (g / den)           |                     | Cohesion (No. of strokes)    |                     |
|----------------------------------------------|------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|
|                                              | Open pan Cooking             | Pressurised cooking | Open pan cooking             | Pressurised cooking | Open pan cooking             | Pressurised cooking |
|                                              | Propreté (%)                 |                     | Ténacité (g / den)           |                     | Cohésion (Nbre de passages)  |                     |
|                                              | Cuisson à la bassine ouverte | Cuisson pressurisée | Cuisson à la bassine ouverte | Cuisson pressurisée | Cuisson à la bassine ouverte | Cuisson pressurisée |
| <i>Température de l'eau de la bassine</i>    |                              |                     |                              |                     |                              |                     |
| 30° C                                        | 84.5                         | 92                  | 3.73                         | 3.7                 | 47                           | 79                  |
| 40° C                                        | 88                           | 95                  | 3.78                         | 3.74                | 55                           | 86                  |
| 50° C                                        | 88                           | 94.5                | 3.88                         | 3.82                | 78                           | 97                  |
| 60° C                                        | 86.5                         | 90                  | 3.75                         | 3.73                | 73                           | 82                  |
| 70° C                                        | 84.5                         | 89                  | 3.65                         | 3.71                | 68                           | 72                  |
| CD (P <= 0.5) for cooking method (A)         |                              | 1.576               |                              | 0.028               |                              | 2.627               |
| CD (P <= 0.5) pour la méthode de cuisson (A) |                              |                     |                              |                     |                              |                     |
| Basin water temperature (B)                  |                              | 2.491               |                              | 0.045               |                              | 4.154               |
| Température de l'eau de la bassine (B)       |                              |                     |                              |                     |                              |                     |
| A × B                                        |                              | 3.523               |                              | 0.063               |                              | 5.874               |

Significant improvement in cleanness of raw silk in the case of pressurised cooking method as compared to single pan cooking method is attributed to better swelling and softening of sericin of cocoon filament cross over points in all the layers of cocoon shell.

#### **Tenacity:**

Results given in the Table I and Figure 4 indicate that the pressurised cooking method associated with 50° C reeling basin water temperature has given better tenacity of raw silk as compared to other conditions.

It is observed (Table II) that influence of reeling basin water temperature on tenacity of raw silk is significant at 1% level, whereas influence of cocoon cooking method on tenacity of raw silk is insignificant.

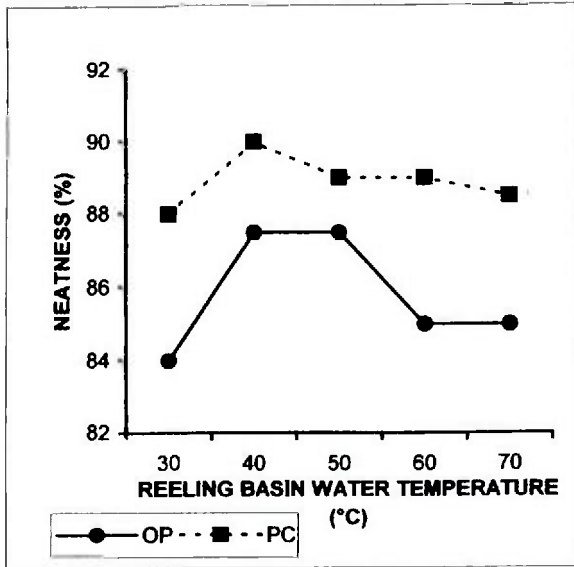


**Fig. 1. Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on neatness of raw silk.**

OP – Open pan cooking. PC – Pressurised cooking.

*Fig. 1. Influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur la netteté de la soie grège.*

OP – Cuisson à la bassine ouverte. PC – Cuisson pressurisée.

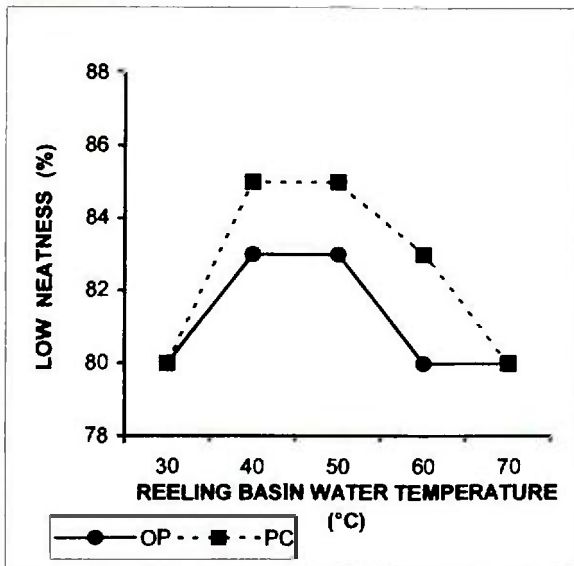


**Fig. 2. Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on low neatness of raw silk.**

OP – Open pan cooking. PC – Pressurised cooking.

*Fig. 2. Influence des conditions de cuisson du cocon et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur la faible netteté de la soie grège.*

OP – Cuisson à la bassine ouverte. PC – Cuisson pressurisée.

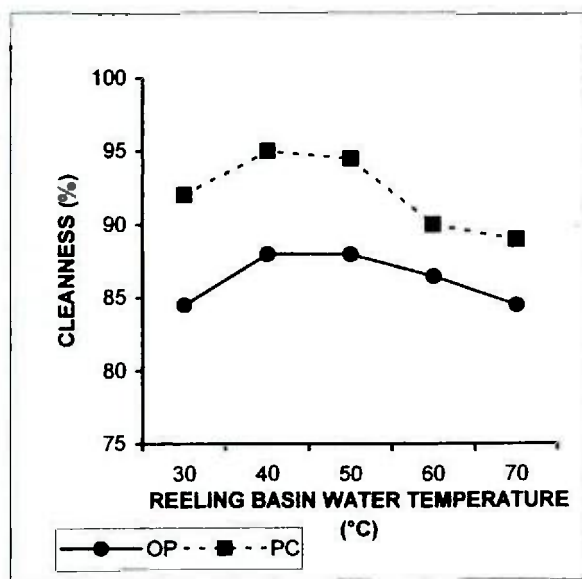


Fig. 3. Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on cleanliness of raw silk.  
OP – Open pan cooking, PC – Pressurised cooking.

*Fig. 3. Influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur la propreté de la soie de la grège.*

OP – Cuisson à la bassine ouverte. PC – Cuisson pressurisée.

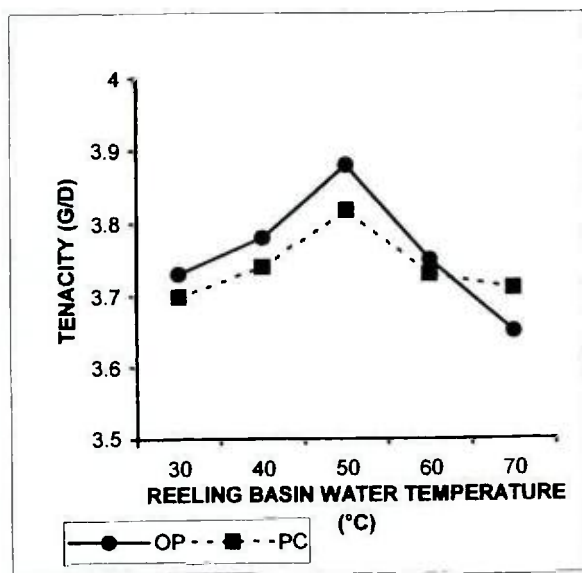


Fig. 4. Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on tenacity of raw silk.  
OP – Open pan cooking, PC – Pressurised cooking.

*Fig. 4. Influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur la ténacité de la soie grège.*

OP – Cuisson à la bassine ouverte. PC – Cuisson pressurisée.

Table II. Analysis of variance of quality characteristics of raw silk.

Tableau II. Analyse de variance pour les caractéristiques de qualité de la soie grège.

| Factors                                                       | Mean sum of squares |          |                |           |          |             |            |
|---------------------------------------------------------------|---------------------|----------|----------------|-----------|----------|-------------|------------|
|                                                               | Degree of Freedom   | Neatness | Low neatness   | Cleanness | Tenacity | Elongation  | Cohesion   |
| Facteurs                                                      | Degrés de liberté   | Netteté  | Faible netteté | Propreté  | Ténacité | Allongement | Cohésion   |
| Cooking methods (A)<br><i>Méthodes de cuisson (A)</i>         | 1                   | 48.050** | 9.800NS        | 168.200** | 0.002NS  | 19.503**    | 1786.050** |
| Basin temperature (B)<br><i>Température de la bassine (B)</i> | 4                   | 5.075**  | 16.200NS       | 17.300**  | 0.015**  | 6.731**     | 3.43.425** |
| A × B                                                         | 4                   | 1.175NS  | 1.800NS        | 2.950NS   | 0.002NS  | 1.160**     | 159.925**  |
| Error / Ecart                                                 | 10                  | 0.040    | 0.000          | 2.500     | 0.001    | 0.123       | 6.950      |

\*\* Significant at 1% level / *Significatif au seuil de 1 %*. \* Significant at 5% level. NS: Non significant / *Non-significatif*.

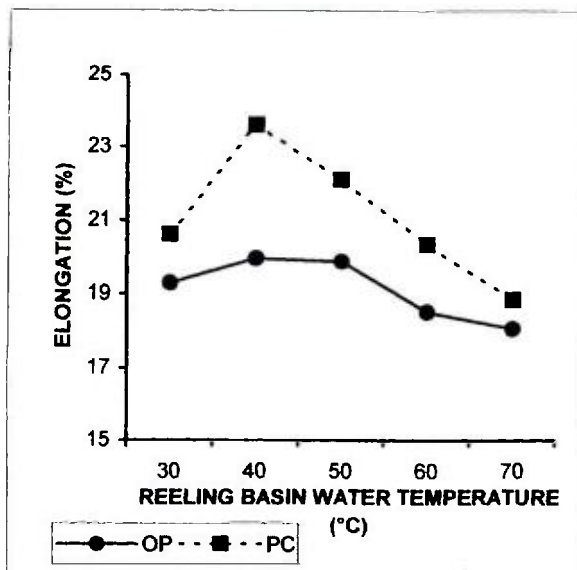


Fig. 5. Influence of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on elongation of raw silk.

OP – Open pan cooking. PC – Pressurised cooking.

Fig. 5. Influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur l'allongement de la soie grège.

OP – Cuisson à la bassine ouverte. PC – Cuisson pressurisée.

**Elongation of raw silk:**

Table I and Figure 5 show that pressurised cooking method associated with 40° C reeling basin water temperature has given better elongation of raw silk as compared to other conditions. The analysis of variance results indicate (Table II) that influence of cooking method and basin water temperature on elongation of raw silk is significant at 1% level.

Significant reduction in elongation of raw silk in the case of single pan cooking and 30° C basin water temperature is attributed to under cooking of cocoons. Whereas significant improvement as compared to that of open pan cooking method is attributed to better swelling and softening of sericin of cocoon filament cross over points in the cocoon shell in the case of pressurised cooking method. Better softening of sericin of cocoon filament cross over points, reduces the filament unwinding tension significantly leading to better elongation of raw silk.

From the figure 5, it is observed that elongation of raw silk is found to decrease as the reeling basin water temperature increases. Reduction in elongation of raw silk at higher basin water temperature is attributed to over softening of sericin of cocoon filament layers. It is to be noted that cocoon filaments can be stretched easily in overcooked condition.

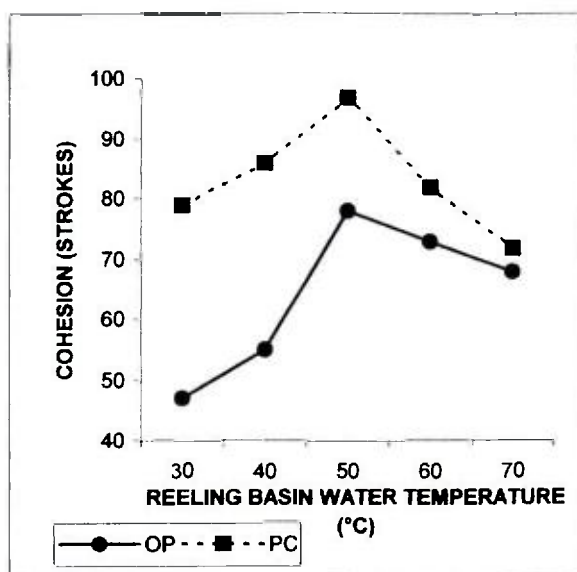


**Fig. 6. Influence of cocoon cooking and reeling basin water temperature on cohesion of raw silk.**

OP – Open pan cooking, PC – Pressurised cooking.

*Fig. 6. Influence des conditions de cuisson des cocon et de la température de l'eau de la bassin de dévidage sur la cohésion de la soie grège.*

OP – Cuisson à la bassin ouverte, PC – Cuisson pressurisée.

**Cohesion of raw silk:**

Results given in Tables I and II show that influence of cooking method, reeling basin water temperature and interaction effect of cooking method and reeling basin water temperature on cohesion of raw silk is significant at 1% level. From the figure 6, it can be seen that reeling basin water temperatures of 40° C and 50° C and pressurised cooking method have given significantly better cohesion of raw silk as compared to the other conditions.

Critical difference values (Table I) indicate that differences in cohesion of raw silk between 50° C and 30° C, between 50° C and 40° C, between 50° C and 60° C and between 50° C and 70° C reeling basin water temperatures are significant at 5% level.

Low cohesion of raw silk with single pan cooking is attributed to under / uneven swelling and softening of sericin due to under cooking leading to poor agglutination force between the filaments in the raw silk.

Significant reduction in cohesion of raw silk at higher basin water temperature of 60° C and 70° C as compared to 50° C reeling basin water temperature may be attributed to higher dissolution of sericin in the reeling basin during reeling.

## CONCLUSION

Cocoon cooking condition and reeling basin water temperature have a significant influence on quality characteristics of raw silk. Under cooking condition affect the quality of raw silk significantly. Results indicate that good cooking of cocoons and medium basin water temperature are the essential factors for achieving good quality raw silk.

Low reeling basin water temperature reduces cleanness, elongation and cohesion of raw silk, whereas if the reeling basin water temperature is too high, it brings down the cleanness raw silk significantly. Reeling basin water temperature has to be selected on the basis of cocoon quality and cocoon cooking conditions.

From the results and discussions it can be concluded that 40° C – 50° reeling basin temperature associated with good cooking is required for achieving better quality characteristics of raw silk from multibivoltine cocoons.

## REFERENCES

- KOJIMA (1985) "Reeling basin temperature and reeling results", Reeling Section Research report, Cocoon testing house Gumma ken, Japan No. 1, pp 81-107.
- HOSHINO (1957) "Reeling basin temperature and hydrogen ion concentrations and reeling results" Summary of silk reeling research report, Japan Silk Association, No. 7, pp. 203-207.
- KONNO (1962) Study related to problems in reeling tension and yarn quality, Raw Silk No. 11, Japan 26-28.
- SUBHAS V. NAIK (2004) Studies on bivoltine reeling Part II. Effect of cocoon cooking condition and reeling basin water temperature on quality characteristics of raw silk of Indian bivoltine hbrid cocoons, The Japanese society of Silk Science and Technology, Vol. 13 43-49.
- SONWALKAR T. N. (1992) "Review of research work in post cocoon harvest technology in India" *Sericologia* 32(1), 1-26.

## **ETUDES SUR LE DEVIDAGE : DEUXIEME PARTIE : EFFET DES CONDITIONS DE CUISSON DES COCONS ET DE LA TEMPERATURE DE L'EAU DE LA BASSINE DE DEVIDAGE SUR LES CARACTERISTIQUES QUALITATIVES DE LA SOIE GREGE CHEZ LES COCONS POLYBIVOLTINS INDIENS**

**SUBHAS V. NAIK\* & T. H. SOMASHEKAR**

Central Silk Technological Research Institute (CSRTI), Central Silk Board, BTM Layout,  
Madiwala, Bangalore – 560 068, Inde.

*Nous avons étudié l'influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur la qualité de la soie grège chez les cocons polybivoltins indiens. On procède à la cuisson des cocons en adoptant la méthode de cuisson dans une bassine unique et de cuisson pressurisée, tandis que l'on maintient des températures de l'eau de la bassine de dévidage à 30° C, 40° C, 50° C, 60° C et 70° C pour l'étude. Les caractéristiques de qualité de la soie grège, c'est à dire la netteté, la propreté, la ténacité, l'allongement et la cohésion de la soie grège s'avèrent être très influencées à la fois par les conditions de cuisson des cocons et la température de l'eau de la bassine de dévidage. La méthode de cuisson pressurisée associée à une température de l'eau de la bassine de dévidage de 40° C donne de meilleures caractéristiques de qualité de la soie grège par comparaison aux autres conditions. La méthode de cuisson dans une bassine unique et une faible température de l'eau de 30° C ont un effet significatif sur la netteté, la propreté, l'allongement et la cohésion de la soie grège. Une température plus élevée de l'eau de la bassine de 60° C - 70° C a aussi un effet considérable sur la propreté, l'allongement et la cohésion de la soie grège. Les résultats indiquent que la cuisson des cocons au niveau requis et le maintien d'une température de l'eau de la bassine de dévidage à 40° C - 50° C sont essentiels pour obtenir de meilleures caractéristiques de qualité de la soie grège.*

### **INTRODUCTION**

La température de l'eau de la bassine de dévidage est l'un des paramètres importants du processus de dévidage. La littérature révèle que la température de l'eau de la bassine de dévidage doit varier en fonction de la qualité des cocons et des conditions de cuisson (Kojima, 1985). Des études sur l'influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur les caractéristiques de qualité de la soie grège chez les cocons hybrides bivoltins ont été réalisées (Hoshino, 1957 ; Konno, 1962, Subhas 2004). Pour obtenir les meilleurs résultats, ce type d'étude est aussi essentiel chez les cocons polybivoltins indiens. Les cocons polybivoltins sont en général moins compacts, de structure lâche avec une faible teneur en coque (Sonwalkar, 1992). L'information à ce sujet est rare. Ces informations sont assez utiles pour l'industrie de dévidage de la soie indienne. On a donc entrepris cette recherche pour étudier l'influence des conditions de cuisson des cocons et de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur les caractéristiques de qualité de la soie grège chez les cocons polybivoltins indiens.

---

\* Auteur auquel adresser la correspondance.

## MATERIELS ET METHODES

### 1. Matière première :

On utilise des cocons polybivoltins (PM × NB4D2) achetés sur les marchés aux cocons auprès du gouvernement.

### 2. Conception expérimentale :

La conception expérimentale fait varier les conditions de cuisson (2 types, c'est à dire la méthode de cuisson ouverte à la bassine et pressurisée et la température de l'eau de la bassine de dévidage (5 niveaux c'est à dire 30° C, 40° C, 50° C, 60° C et 70° C) pour une analyse à deux facteurs.

### 3. Séchage des cocons :

On sèche les cocons à l'air chaud au niveau optimal en utilisant un profil de température de 115° C à 55° C pendant quatre heures et demi.

### 4. Cuisson des cocons :

Avec la bassine unique, on cuit les cocons en utilisant une température de 93° C - 95° C pendant une durée de deux minutes. On procède à la cuisson pressurisée en utilisant une machine de cuisson circulaire pressurisée en employant les paramètres de cuisson suivants :

|                                                  | Température   | Durée        |
|--------------------------------------------------|---------------|--------------|
| a. Conditions de cuisson                         | 70° C         | 45 secondes  |
| b. Traitement à température élevée (vapeur)      | 90° C         | 30 secondes  |
| c. Traitement d'imprégnation à basse température | 75° C         | 60 secondes  |
| d. Traitement de cuisson                         | 95° C         | 30 secondes  |
| e. Traitement d'ajustement                       | 95° C à 75° C | 240 secondes |

### 5. Purgeage :

On purge les cocons cuits dans une eau à 80° C.

### 6. Dévidage :

On dévide les cocons sur une machine de dévidage multibouts du CSRTI en adoptant cinq températures différentes pour l'eau de la bassine avec les paramètres suivants :

Vitesse de dévidage 100 m / min

Longueur de croisure 8 cm

Température de l'eau de la bassine de dévidage : 30° C, 40° C, 50° C, 60° C et 70° C

Des filières de dévidage du CSTRI avec un trou d'un diamètre de 250 microns

### 7. Imprégnation avec un petit dévidoir :

On trempe les petits dévidoirs dans de l'eau en utilisant une chambre d'imprégnation pour petit dévidoir avec une pression de vide de 300 mm Hg. On répète le cycle trois fois.

#### **8. Reflottage :**

On reflotte la soie grège en utilisant une machine de reflottage de type fermé du CSTRI avec une vitesse de reflottage de 225 tpm, une température de 40° C et une HR de 45 %.

#### **9. Qualité de l'eau :**

On utilise de l'eau avec un pH de 7,1, une dureté de 70 ppm et une alcalinité de 80 ppm pour l'étude.

#### **10. Test de la soie grège :**

On teste les caractéristiques de netteté, de propreté des échantillons de soie grège en utilisant un testeur Seriplane et les caractères de cohésion en utilisant un testeur de cohésion Duplan en adoptant la procédure de l'AIS (Association Internationale de la Soie). De plus, on teste la ténacité et l'allongement de la soie grège en utilisant un testeur de la rupture Instron (modèle 5500) en suivant la procédure standard.

#### **11. Analyse statistique :**

On analyse les données recueillies sur le plan statistique en utilisant une analyse de variance à deux facteurs.

### **RESULTATS ET DISCUSSION**

Les résultats moyens concernant l'effet des conditions de cuisson des cocons et de la température sur les caractéristiques de qualité de la soie grège sont présentés dans le Tableau I et les Figures 1 à 6. Les résultats de l'analyse de variance sont présentés dans le Tableau II.

#### **% de netteté et de mauvaise netteté :**

Les résultats indiquent que la méthode de cuisson des cocons et la température de l'eau de la bassine de dévidage ont une influence significative (au seuil de 1 %) sur la netteté de la soie grège (Figure 1 et Tableau II), tandis que l'influence de ces paramètres sur la faible netteté de la soie grège n'est pas significative (Figure 2 et Tableau II). On observe (Figure 1) que la méthode de cuisson pressurisée avec une température de l'eau de la bassine de dévidage à 40° C donne une meilleure netteté de la soie grège par comparaison aux autres conditions. On attribue cela aux meilleurs gonflement et amollissement uniformes de la séricine des points de croisement dans toutes les couches de la coque soyeuse.

On constate que la netteté de la soie grège diminue lorsque la température de l'eau de la bassine de dévidage augmente. Cela est dû au fait qu'avec une température de l'eau de la bassine de dévidage plus élevée, certains des points de croisement du filament ramollissent trop et se déroulent sans se détendre pendant le dévidage, ce qui entraîne la formation de défauts de netteté tels que de petites boucles et de petits bouchons, etc... dans le fil.

Les valeurs DC présentées dans le Tableau I montrent que les différences de netteté de la soie grège entre des températures de l'eau de la bassine de dévidage de 30° C et 40° C ; 40° et 50° C et de 40° C et de 70° C sont significatives au seuil de 5 %.

#### **Propreté de la soie grège :**

Le Tableau II montre que l'influence de la condition de cuisson du cocon et de la température de l'eau de la bassine sur la propreté de la soie grège est significative au seuil de 1 %. D'après la figure 3, on constate que la méthode de cuisson pressurisée associée avec une température de l'eau de la bassine de dévidage de 40° C donne une meilleure propreté de la soie grège. On observe (Figure 3) que la propreté de la soie grège augmente à partir d'une température de l'eau de la bassine de 30° C

jusqu'à une température de l'eau de la bassine de 40° C et puis elle baisse alors que la température de l'eau de la bassine augmente.

Les valeurs DC (Tableau I) indiquent que les différences de propreté de la soie grège entre 40° C et 30° C, 40° C et 60° C et 40° C et 70° C sont significatives au seuil de 5 %. La diminution de la propreté de la soie grège avec une température de l'eau de la bassine de dévidage de 30° C par comparaison à celle obtenue avec une température de l'eau de la bassine de dévidage de 40° C pourrait être due au fait que la sérécine gonflée et amollie durcit avec une faible température de l'eau de la bassine de 30° C et cela pourrait entraîner la génération de plus de boucles particulièrement à partir des points de croisement durs agglutinés.

La diminution de la propreté de la soie grège avec une température de l'eau de la bassine plus élevée est due au fait qu'avec une température de l'eau de la bassine plus élevée, la sérécine gonflée et amollie de certains des points de croisement du filament (probablement faiblement agglutinés) s'amollit trop pendant le processus de dévidage (particulièrement pendant le dévidage des couches internes de la coque soyeuse), ce qui entraîne plus de défauts dans la soie grège. A leur tour, ces défauts ont un effet sur la propreté de la soie grège.

On attribue l'amélioration considérable de la propreté de la soie grège avec la méthode de cuisson pressurisée par rapport à la cuisson dans une bassine aux meilleurs gonflement et ramollissement de la sérécine dans les points de croisement du filament de cocon de toutes les couches de la coque soyeuse.

#### **Résistance :**

Les résultats présentés dans le Tableau I et la figure 4 indiquent que la méthode de cuisson pressurisée associée à une température de l'eau de la bassine de dévidage de 50° C donne une meilleure résistance de la soie grège par comparaison aux autres conditions.

On observe (Tableau III) que l'influence de la température de l'eau de la bassine de dévidage sur la ténacité de la soie grège est significative au seuil de 1 %, tandis que l'influence de la méthode de cuisson du cocon sur la résistance de la soie grège n'est pas significative.

#### **Allongement de la soie grège :**

Le Tableau I et la Figure 5 montrent que la méthode de cuisson pressurisée associée à une température de l'eau de la bassine de dévidage de 40° C donne un meilleur allongement de la soie grège par comparaison aux autres conditions. Les résultats de l'analyse de variance indiquent (Tableau II) que l'influence de la méthode de cuisson et de la température de l'eau de la bassine sur l'allongement de la soie grège est significative au seuil de 1 %.

On attribue la diminution significative de l'allongement de la soie grège dans le cas de la cuisson avec une bassine et de la température de l'eau de la bassine de 30° C au manque de cuisson des cocons. Tandis qu'on attribue l'amélioration considérable avec la cuisson pressurisée par comparaison à la cuisson dans une bassine ouverte aux meilleurs gonflement et amollissement de la sérécine aux points de croisement du filament de la coque soyeuse. Le meilleur amollissement de la sérécine dans les points de croisement du filament de cocon diminue considérablement la tension de déroulement et donne un meilleur allongement de la soie grège.

D'après la figure 5, on observe que l'allongement de la soie grège diminue lorsque la température de l'eau de la bassine de dévidage augmente. On attribue la diminution de l'allongement de la soie grège avec une température de l'eau de la bassine plus élevée au trop grand ramollissement de la sérécine dans les couches du filament de cocon. On constate qu'on peut facilement étirer les filaments de cocon dans une condition de cuisson trop importante.

#### **Cohésion de la soie grège :**

Les résultats présentés dans les Tableaux I et II montrent que l'influence de la méthode de cuisson, de la température de l'eau de la bassine de dévidage et l'effet d'interaction entre la méthode de cuisson

et la température de l'eau de la bassine de dévidage sur la cohésion de la soie grège est significative au seuil de 1 %. D'après la figure 6, on peut voir que les températures de l'eau de la bassine de 40° C et de 50° C et la méthode de cuisson pressurisée donnent une cohésion considérablement meilleure de la soie grège par comparaison aux autres conditions.

Les valeurs pour la différence critique (Tableau I) indiquent que les différences de cohésion de la soie grège entre des températures de l'eau de la bassine de dévidage de 50° C et 30° C, entre 50° C et 40° C, entre 50° C et 60° C et entre 50° C et 70° C sont significatives au seuil de 5 %.

On attribue la faible cohésion de la soie grège avec une cuisson dans une bassine au gonflement mauvais / irrégulier de la séricine à cause de la sous-cuisson, ce qui entraîne une mauvaise force d'agglutination entre les filaments de la soie grège.

On pourrait attribuer la diminution importante de la cohésion de la soie grège à une température plus élevée de l'eau de la bassine de 60° et de 70° C par comparaison à la température de l'eau de la bassine de dévidage de 50° C à la dissolution plus élevée de la séricine dans la bassine au cours du dévidage.

## CONCLUSION

Les conditions de cuisson du cocon et la température de l'eau de la bassine de dévidage ont une influence considérable sur les caractéristiques de qualité de la soie grège. La sous-cuisson a un effet considérable sur la condition de la soie grège. Les résultats indiquent que la bonne cuisson des cocons et une température moyenne de l'eau de la bassine sont des facteurs essentiels pour obtenir une bonne qualité de soie grège.

La faible température de l'eau de la bassine de dévidage diminue la propreté, l'allongement et la cohésion de la soie grège, tandis que si la température de l'eau de la bassine de dévidage est trop élevée, cela diminue considérablement la propreté de la soie grège. On doit sélectionner la température de l'eau de la bassine de dévidage sur la base de la qualité des cocons et d'après les conditions de cuisson du cocon.

D'après les résultats et les discussions, on peut conclure qu'il faut une température de la bassine de dévidage de 40° C-50° C associée à une bonne cuisson pour obtenir de meilleures caractéristiques de qualité de la soie grège avec des cocons polybivoltins.

## MULBERRY LEAF ENRICHMENT THROUGH KOHIKO SILCARE FEED SUPPLEMENT AND ITS EFFECT ON REARING PERFORMANCE OF SILKWORM HYBRID

T. K. NARAYANASWAMY, M. A. SHANKAR & B. SANNAPPA

Department of Sericulture & Dryland Agriculture Project, UAS, GKVK, Bangalore – 560 065, India.

*An investigation was carried out to know the influence of enriched mulberry leaf with Kohiko Silcare feed supplement on growth, economic traits of cocoons and silk characters of CSR silkworm (*Bombyx mori* L.) hybrid (CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub>) at the Department of Sericulture, UAS, Bangalore during 2002. The enrichment of mulberry leaf with Kohiko Silcare as feed supplement @ 1000 g / 100 DFLs recorded significantly higher mature larval weight, lower larval mortality, shorter fifth instar and total larval duration, higher cocoon and shell weights, shell ratio, silk productivity, single cocoon filament length, pupal weight and rate of pupation. The returns per rupee investment was higher when the worms were fed with mulberry leaf treated with Kohiko Silcare @ 1000 g / 100 DFLs. Indeed, the use of Kohiko Silcare yielded higher returns through better effective rate of rearing, higher cocoon and shell weights in addition to improved single cocoon filament length. Further, the impact of Kohiko Silcare was also seen even when the worms were fed on mulberry leaf sprayed with Kohiko Silcare in one or two feeds. But one noteworthy point is that spraying of this product for all the feeds is more effective than spraying only in one or two splits.*

**Keywords:** Mulberry, kohiko silcare, silkworm, *Bombyx mori*, feed supplement.

### INTRODUCTION

Mulberry silkworm, *Bombyx mori* L., feeds only on mulberry leaf throughout its larval stage. Hence, the leaf quality plays a very important role in silkworm biology. It is also clear from the literature that the mulberry leaf contributes to the tune of 38 per cent to crop success. Therefore, maintenance of mulberry leaf quality in addition to yield is very important. To maintain both, the appropriate mulberry agronomic practices play a very important role. Nutrients are mainly supplied to mulberry as soil applicants for absorption through roots. These however, are not fully utilized mainly due to fixation and leaching losses. An alternative to this is supplementing them as foliar spray for easy availability and cost effectiveness. Foliar application of micronutrients either single or in combination increases all the quantitative and qualitative parameters of leaf (Vishwanath, 1996). Jyothi (2000) found that the foliar application of "Daman Panshibao" increased all the economic characters of mulberry leaf. Improving the leaf quality even after harvest before feeding is also very important. Hence, an attempt was made in this line using Kohiko Silcare the only feed supplement developed by Kohiko India, Bangalore for enriching harvested mulberry leaf before feeding to know its effect on rearing performance of CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub> hybrid.

## MATERIALS AND METHODS

Bioassay study was conducted on CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub> hybrid to know the effect of Kohiko Silcare feed supplement on growth of silkworm, economic traits of cocoons and silk characters at the department of Sericulture, Main research Station (MRS), UAS, Hebbal, Bangalore during 2002.

The leaf used for bioassay study was from five years old irrigated M<sub>5</sub> mulberry garden raised as per the package of practice. The CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub> eggs were procured from the Government Model Grainage, Hassan and reared as per package of practice (Dandin *et al.*, 2000). The experiment consisted of five treatments with three replications of three DFLs each and the experiment was repeated twice. The silkworms were fed with the leaf after spraying Kohiko Silcare feed supplement @ 1000, 800 and 600 g / 100 DFLs. In addition, two more treatments, one with water spray and another with normal feeding was maintained. The larval, cocoon and silk parameters were recorded. The benefit: cost ratio was calculated by taking the present value of benefit divided by the present value of costs involved for cocoon production (Jolly, 1982). The experimental data was statistically analysed and interpreted as per the methods prescribed by Sundararaj *et al.*, (1972).

## RESULTS AND DISCUSSION

The influence of Kohiko Silcare sprayed mulberry leaf feeding effect on silkworm are tabulated in Tables I, II and III and interpreted hereunder.

The mature larval weight was significantly higher when the silkworms were fed on the mulberry leaf sprayed with 1000 g / 100 DFLs feed supplement (38.6 g / 10) followed by worms fed on leaf with 800 g / 100 dfls (37.5 g / 10).

The fifth instar and total larval duration were significantly shorter with 1000 g / 100 dfls (6: 23 and 24 : 15 d : h) when compared to normally fed worms (8 : 13 and 26 : 17 d : h). The reduction in larval duration and that of fifth instar known as maximum feeding stage could save up to 20 percent of leaves which helps to brush more number of DFLs per unit area of mulberry garden and provides additional income to the sericulturists.

Silkworms fed on Kohiko Silcare at 1000 g / 100 DFLs recorded higher cocoon weight (1.75 g), shell weight (0.335 g), shell ratio (19.14%), silk productivity (5.377 cg / day), single cocoon filament length (1158 m), pupal weight (1.36 g) and rate of pupation (74.83%). The larval mortality percentage was lower (14.00%) when the silkworms were fed with Kohiko Silcare sprayed mulberry leaf @ 1000 g / 100 dfls.

The returns per rupee investment was higher when the worms were fed with mulberry leaf supplemented with Kohiko Silcare @ 1000 g / 100 dfls (Rs. 6.09) (Rs. 10545 net profit) this was followed by feeding of worms with 800 g / 100 dfls (Rs. 5.49) (Rs. 9582 net profit) when compared to rearing of worms with normal feeding methods (Rs. 5.37) (Rs. 7657 net profit). Which emphasizes the role of Kohiko Silcare in yielding higher returns through better ERR, higher cocoon weight, shell weight in addition to improved filament length.

By analyzing the overall performance of silkworms and economic traits of cocoons, it is evident from the data that Kohiko Silcare product has got a profound influence on the growth of silkworms and in turn on spinning of quality cocoons which is proved by improvement in cocoon weight, shell weight, shell ratio filament length etc. when compared to feeding of worms on mulberry leaves sprayed with water or without water. This better performance of silkworms on Kohiko Silcare feed supplement can be attributed to its nutritional status. However, rearing of fifth instar worms on mulberry leaf enriched with soyabean flour has also resulted in higher larval, cocoon and silk parameters (Sundar Raj *et al.*, 2001). Further, the impact of Kohiko Silcare was also seen even when the worms were fed on mulberry leaf sprayed with Kohiko Silcare in one or two feeds. But one noteworthy point is that spraying of this product for all the feeds is more effective rather than spraying in one or two splits.

**Table I. Impact of Kohiko Silcare feed supplement on larval and cocoon traits of CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub>.****Tableau I. Impact du supplément nutritionnel Kohiko Silcare sur les caractères de la larve et du cocon de CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub>.**

| Treatments                                                                                                                             | Mature larval weight (g/10)    | 5 <sup>th</sup> instar larval duration (d : h) | Total larval duration (d : h) | Larval mortality (%)   | Cocoon weight (g)  | Shell weight (g)      | Shell ratio (%)      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|
| Traitements                                                                                                                            | Poids larvaire mature (g / 10) | Durée du 5 <sup>ème</sup> âge (j : h)          | Durée larvaire totale (j : h) | Mortalité larvaire (%) | Poids du cocon (g) | Poids de la coque (g) | Richesse soyeuse (%) |
| T1 = 1000 g* / 100 dfls                                                                                                                | 38.60                          | 6.23                                           | 24.15                         | 14.00                  | 1.75               | 0.335                 | 19.14                |
| T2 = 800 g* / 100 dfls                                                                                                                 | 37.50                          | 7.09                                           | 25.17                         | 16.50                  | 1.69               | 0.320                 | 18.92                |
| T3 = 600 g* / 100 dfls                                                                                                                 | 37.40                          | 7.13                                           | 25.23                         | 19.00                  | 1.67               | 0.305                 | 18.27                |
| T4 = Water spray <sup>1</sup> / Vaporisation d'eau <sup>1</sup>                                                                        | 37.05                          | 7.14                                           | 26.06                         | 24.00                  | 1.57               | 0.290                 | 18.17                |
| T5 = Control / Témoin <sup>2</sup>                                                                                                     | 36.75                          | 8.13                                           | 26.17                         | 25.50                  | 1.55               | 0.290                 | 17.89                |
| T6 = 1000 g / 100 dfls in 1 feed / day <sup>3</sup><br>T6 = 1000 g / 100 pontes saines en un repas / jour <sup>3</sup>                 | 37.10                          | 8.00                                           | 25.28                         | 15.00                  | 1.79               | 0.350                 | 19.55                |
| T7 = 1000 g <sup>4</sup> / 100 dfls in 2 feeds / day <sup>4</sup><br>T7 = 1000 g / 100 pontes saines en deux repas / jour <sup>4</sup> | 38.00                          | 7.24                                           | 25.09                         | 13.09                  | 1.82               | 0.350                 | 19.23                |
| F-test                                                                                                                                 | *                              | *                                              | *                             | *                      | *                  | *                     | *                    |
| S. Em ±                                                                                                                                | 0.35                           | 0.03                                           | 0.17                          | 0.07                   | 0.04               | 0.006                 | 0.12                 |
| C. D. at 5%                                                                                                                            | 1.07                           | 0.08                                           | 0.51                          | 0.21                   | 0.12               | 0.018                 | 0.37                 |

\* = Kohiko Silcare ;

1 = @ 200 ml / kg of leaf / 200 ml / kg de feuilles

2 = Normal feeding without water spray / nourrissage normal sans vaporisation d'eau

3 = 10 a. m. feed / repas à 10 heures ;

4 = 10 a.m and 3 a. m. feeds / repas à 10 heures et à 3 heures

dfl: Disease free laying / ponte saine.

**Table II. Impact of Kohiko Silcare feed supplement on post-cocoon and pupal traits of CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub>.***Tableau II. Impact du supplément nutritionnel Kohiko Silcare sur les caractères post-cocon et de la nymphe chez CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub>.*

| Treatments                                                                                                                | Silk productivity<br>(cg / day)                    | Single<br>cocoon<br>filament<br>length (m)         | Pupal<br>weight<br>(g)                | Rate of<br>pupation<br>(%)           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Traitements</i>                                                                                                        | <i>Productivité<br/>de la soie<br/>(cg / jour)</i> | <i>Longueur<br/>du filament<br/>d'un cocon (m)</i> | <i>Poids de<br/>la nymphe<br/>(g)</i> | <i>Taux de<br/>nympheose<br/>(%)</i> |
| T1 = 1000 g* / 100 dfls                                                                                                   | 5.377                                              | 1158.0                                             | 1.36                                  | 74.83                                |
| T2 = 800 g* / 100 dfls                                                                                                    | 4.513                                              | 1105.0                                             | 1.33                                  | 72.81                                |
| T3 = 600 g* / 100 dfls                                                                                                    | 4.278                                              | 1022.0                                             | 1.31                                  | 68.00                                |
| T4 = Water spray <sup>1</sup> / Vaporisation d'eau <sup>1</sup>                                                           | 4.062                                              | 1012.0                                             | 1.22                                  | 63.00                                |
| T5 = Control <sup>2</sup> / Témoin <sup>2</sup>                                                                           | 3.567                                              | 1023.0                                             | 1.26                                  | 60.50                                |
| T6 = 1000 g / 100 dfls in 1 feed / day <sup>3</sup><br>T6 = 1000 g / 100 pontes saines<br>en 1 repas / jour <sup>3</sup>  | 4.375                                              | 1096.0                                             | 1.40                                  | 76.00                                |
| T7 = 1000 g / 100 dfls in 2 feeds / day <sup>4</sup><br>T7 = 1000 g / 100 pontes saines<br>en 2 repas / jour <sup>4</sup> | 4.834                                              | 1310.0                                             | 1.41                                  | 77.00                                |
| F-test                                                                                                                    | *                                                  | *                                                  | *                                     | *                                    |
| S. Em±                                                                                                                    | 0.023                                              | 19.6                                               | 0.01                                  | 0.43                                 |
| C. D. at 5%                                                                                                               | 0.071                                              | 59.5                                               | 0.04                                  | 1.31                                 |

\* Kohiko Silcare ;

1 = @ 200 ml / kg of leaf / à raison de 200 ml / kg de feuilles ;

2 = Normal feeding without water spray / repas normal sans vaporisation d'eau.

3 = 10 a. m. feed / repas à 10 heures ;

4 = 10 a. m. and 3 a. m. feeds / repas à 10 heures et 3 heures.

dfl: Disease free laying / ponte saine.

**Table III. Economics of CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub> silkworm rearing on the Kohiko Silcare sprayed mulberry leaf (100 dfls).****Tableau III. Aspects économiques de l'élevage du ver à soie CSR<sub>2</sub> × CSR<sub>4</sub> avec des feuilles de mûrier vaporisées avec du Kohiko Silcare (100 pontes saines).**

| Treatments                                                      | Cocoon yield<br>(kg / 100 dfls)              | Increase in cocoon yield over control (%)                     | Cocoon value @ Rs. 150 / kg                | Cost of production @ Rs. 50 / man day                   | Additional cost due to treatments (Rs.)      | Additional cocoon production due to leaf saving (kg)                  | Gross profit (Rs.) | Net profit (Rs.) | B : C ratio (Rs.) | Increase in profit over control (%)              |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------|------------------|-------------------|--------------------------------------------------|
| Traitements                                                     | Rendement en cocons (kg / 100 pontes saines) | Augmentation du rendement en cocons par rapport au témoin (%) | Valeur des cocons à raison de 150 Rs. / kg | Coût de production à raison de 50 Rs. / jour de travail | Coût supplémentaire dû aux traitements (Rs.) | Production supplémentaire de cocons due à l'économie de feuilles (kg) | Profit brut (Rs.)  | Profit net (Rs.) | Ratio B : C (Rs.) | Augmentation du profit par rapport au témoin (%) |
| T1 = 1000 g* / 100 dfls / 1000 g* / 100 pontes saines           | 72.25                                        | 15.2                                                          | 10837.5                                    | 1550.0                                                  | 600                                          | 15.05                                                                 | 13095              | 10545            | 6.09              | 13.40                                            |
| T2 = 800 g* / 100 dfls / 800 g* / 100 pontes saines             | 70.56                                        | 12.1                                                          | 10584.0                                    | 1650.0                                                  | 480                                          | 7.52                                                                  | 11712              | 9582             | 5.49              | 2.23                                             |
| T3 = 600 g* / 100 dfls / 600 g / 100 pontes saines              | 67.64                                        | 1.07                                                          | 10146.0                                    | 1750.0                                                  | 360                                          | 3.76                                                                  | 10710              | 8600             | 5.07              | -                                                |
| T4 = Water spray <sup>1</sup> / Vaporisation d'eau <sup>1</sup> | 63.91                                        | -                                                             | 9586.5                                     | 1750.5                                                  | -                                            | -                                                                     | 8835               | 7836             | 5.47              | -                                                |
| T5 = Control <sup>2</sup> / Témoin <sup>2</sup>                 | 62.71                                        | -                                                             | 9406.5                                     | 1750.0                                                  | -                                            | -                                                                     | 8660               | 7657             | 5.37              | -                                                |

\* = Kohiko Silcare;

1 = @ 200 ml / kg of leaf / à raison de 200 ml / kg de feuilles ;

2 = Normal feeding without water spray / Alimentation normale sans vaporisation.

The other important feature of this experiment is that, the moisture on leaf did not have any adverse effect on the silkworm growth and cocoon characters which is usually a feared factor by the farmers. This type of foliar nutrition is safer and eco-friendly perhaps this type of foliar nutrition is pioneering in nature and needs further contamination through large scale demonstration at farmers field.

### ACKNOWLEDGEMENT

The financial assistance provided by the Kohiko India, Bangalore to carry out this study is gratefully acknowledged. Further, the facilities provided for this study by the Professor and Head, Department of Sericulture is also acknowledged.

### REFERENCES

- DANDIN S. B., JAYANT JAYASWAL & GIRIDHAR K. (2000) Handbook of Sericulture Technologies. CSB, Bangalore, p. 287.
- JOLLY M. S. (1982) Economics of sericulture under irrigated conditions. CSR&TI, Mysore, p. 17.
- JYOTHI B. L. (2000) Efficacy of foliar spray of Daman Penshibao on mulberry yield and quality and performance of silkworm. M. Sc. (Seri.) Thesis, UAS, Bangalore, p.85.
- SUNDARARAJ N., NAGARAJU S., VENKATARAMU M. N. & JAGANNATH M. K. (1972) Design and analysis of field experiments. UAS, Bangalore, p. 424.
- SUNDAR RAJ S., NEELU NANGIA, CHINNASWAMY K. P. & SANNAPA B. (2001) Enrichment of rainfed mulberry leaves with protein and its influence on rearing performance of *Bombyx mori* L. Res. on crops, 2: 179-184.
- VISHWANATH G. K. (1996) Effect of foliar nutrition on growth, yield and quality of mulberry in relation to silk cocoon production. M. Sc. (Seri.) Thesis, UAS, Bangalore, p. 102.

## ENRICHISSEMENT DE LA FEUILLE DE MURIER GRACE AU SUPPLEMENT ALIMENTAIRE KOHIKO SILCARE ET ETUDE DE SON EFFET SUR LA PERFORMANCE D'ELEVAGE DE VERS A SOIE HYBRIDES

T. K. NARAYANASWAMY, M. A. SHANKAR & B. SANNAPA

Department of Sericulture & Dryland Agriculture Project, UAS GKVK, Bangalore -560 065, Inde.

*On a réalisé une étude pour connaître l'influence de l'enrichissement de la feuille de mûrier avec le supplément alimentaire Kohiko Silcare sur la croissance, les caractères économiques des cocons et les caractères de la soie chez le ver à soie hybride (CSR2 × CSR4) (Bombyx mori L.) au Département de Sériciculture, UAS, Bangalore en 2002. L'enrichissement de la feuille de mûrier avec du Kohiko Silcare comme supplément alimentaire à raison de 1000 g/ 100 pontes saines donne un poids larvaire mature considérablement plus élevé, une mortalité larvaire plus faible, une durée du 5<sup>ème</sup> âge et une durée larvaire totale plus courtes, des poids de cocon et de coque plus élevés, une richesse soyeuse, une productivité de soie, une longueur de filament, un poids nymphal et un taux de nymphose plus élevés. Les profits par roupie investie sont plus élevés quand on nourrit les vers avec de la feuille de mûrier traitée avec du Kohiko Silcare à raison de 1000 g/ 100 pontes saines. En effet, l'utilisation de Kohiko Silcare donne des profits plus élevés grâce à un meilleur taux effectif d'élevage, des poids de cocons et de coque plus élevés, ainsi qu'une amélioration de la longueur du filament du cocon. De plus, on constate aussi l'impact du Kohiko Silcare même lorsque les vers sont nourris sur de la feuille de mûrier vaporisée avec du Kohiko Silcare pendant un ou deux repas. Mais il est intéressant de noter que la vaporisation de ce produit à tous les repas est plus efficace qu'une vaporisation en une ou deux doses.*

### INTRODUCTION

Le ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* L. ne se nourrit que de feuilles de mûrier pendant tout le stade larvaire. La qualité de la feuille joue donc un rôle très important dans la biologie du ver à soie. Il est aussi clair d'après la littérature que la feuille de mûrier contribue à 38 % au succès de la récolte. Ainsi, le maintien d'une feuille de mûrier de qualité est tout aussi important que le rendement. Pour cela, il est très important d'avoir recours aux pratiques agronomiques appropriées. On apporte les nutriments au mûrier principalement par application dans le sol pour qu'ils soient absorbés par les racines. Cependant, ils ne sont pas complètement utilisés principalement à cause des pertes dues à la fixation et à la filtration. Alternativement, on peut les vaporiser sur les feuilles parce qu'ils sont facilement disponibles et bon marché.

L'application foliaire de micronutriments soit seuls soit en association augmente tous les paramètres quantitatifs et qualitatifs de la feuille (Vishwanath, 1996). Jyothi (2000) a constaté que l'application foliaire de "Daman Penshibao" augmente tous les caractères économiques de la feuille de mûrier. Ainsi, dans cette optique, nous avons essayé d'utiliser le Kohiko Silcare, le seul supplément nutritionnel mis au point par Kohiko, en Inde à Bangalore pour enrichir les feuilles de mûrier récoltées avant les repas afin de connaître son effet sur la performance d'élevage de l'hybride CSR2 × CSR4.

## MATERIELS ET METHODES

On a procédé à l'évaluation biologique de l'hybride CSR2 × CSR4 pour connaître l'effet du supplément nutritionnel de Kohiko Silcare sur la croissance du ver à soie, les caractères économiques du cocon et les caractères de la soie au Département de Sériciculture, Station Principale de Recherche (MRS), UAS, Hebbal à Bangalore en 2002.

La feuille utilisée pour l'évaluation biologique provient d'une mûraie irriguée de M5 de cinq ans cultivés selon l'ensemble de pratiques habituelles. On obtient les œufs de CSR2 × CSR4 auprès du *Government Model Grainage* à Hassan et on les élève en suivant un système de pratiques (Dandin et coll., 2000). L'expérience est constituée de cinq traitements avec trois répétitions de trois pontes saines chacune et on répète l'expérience deux fois. On nourrit les vers à soie avec de la feuille vaporisée avec le supplément alimentaire Kohiko Silcare à raison de 1000, 800 et 600 g / 100 pontes saines. De plus, on maintient deux autres traitements, l'un avec une vaporisation d'eau et l'autre avec une alimentation normale. On enregistre les paramètres de la larve, du cocon et de la soie. On calcule le ratio bénéfice : coût en prenant la valeur actuelle du bénéfice divisée par la valeur actuelle des coûts impliqués dans la production de cocons (Jolly, 1982). On analyse les données expérimentales de manière statistique et on les interprète d'après les méthodes de Sundararaj et coll., (1972).

## RESULTATS ET DISCUSSION

L'influence de l'effet de l'alimentation avec des feuilles de mûrier vaporisées avec du Kohiko Silcare chez le ver à soie est présentée dans les Tableaux I, II et III et interprétée ci-dessous.

Le poids larvaire mature est beaucoup plus élevé quand on nourrit les vers à soie avec de la feuille de mûrier vaporisée avec un supplément nutritionnel de 1000 g / 100 pontes saines (38,6 g / 10) suivis par les vers nourris avec de la feuille vaporisée à raison de 800 g / 100 pontes saines (37,5 g / 10).

Le 5<sup>ème</sup> âge et la durée larvaire sont significativement plus courts avec 1000 g / 100 pontes saines (6 : 23 et 24 : 15 j : h) par comparaison aux vers normalement nourris (8 : 13 et 26 : 17 j : h). La diminution de la durée larvaire et de celle du 5<sup>ème</sup> âge connus comme les âges d'alimentation maximum pourraient permettre d'économiser jusqu'à 20 pour-cent de feuilles, ce qui permettrait de lever un plus grand nombre de pontes saines par unité de surface de mûraie et apporterait un revenu supplémentaire aux sériculteurs.

Les vers à soie nourris sur du Kohiko Silcare à raison de 1000 g / 100 pontes saines enregistrent un poids de cocon (1,75 g), un poids de coque (0,335g), une richesse soyeuse (19,14 %), une productivité de la soie (5,377 cg / jour), une longueur de filament de cocon (1158 m), un poids nymphal (1,36 g) et un taux de nymphose (74,83 %) plus élevés. Le pourcentage de mortalité larvaire est plus faible (14 %) quand on nourrit les vers à soie avec des feuilles de mûrier vaporisées avec du Kohiko Silcare à raison de 1000 g / 100 pontes saines.

Les profits par roupie investie sont plus élevés quand on nourrit les vers avec des feuilles de mûrier supplémentées avec du Kohiko Silcare à raison de 1000 g / 100 pontes saines (6,09 Rs) (profit net de 10545 Rs), suivi par l'alimentation des vers avec 800 g / 100 pontes saines (5,49 Rs.) (profit net de 9582 Rs.) par comparaison à l'élevage des vers avec des méthodes d'alimentation normales (5,37 Rs) (profit net 7657 Rs). Cela souligne le rôle du Kohiko pour obtenir des profits plus élevés grâce à un meilleur ERR, un poids du cocon, et un poids de coque plus élevés tout en améliorant la longueur du filament.

En analysant la performance générale des vers à soie et les caractères économiques des cocons, il est évident, d'après les données, que le Kohiko Silcare a une influence profonde sur la croissance des vers à soie et à son tour sur le filage de cocons de qualité, comme le prouve l'amélioration du poids de la coque, de la richesse soyeuse, de la longueur du filament etc..., par comparaison à l'alimentation des vers avec de la feuille de mûrier vaporisée avec de l'eau ou sans eau. On peut attribuer cette meilleure performance des vers à soie avec le supplément nutritionnel Kohiko Silcare à sa teneur nutritionnelle. Cependant, l'élevage des vers du 5<sup>ème</sup> âge sur de la feuille de mûrier enrichie

avec de la farine de soja entraîne aussi des paramètres de la larve, du cocon et de la soie plus élevés (Sundar Raj et coll., 2001). De plus, on enregistre aussi un impact du Kohiko Silcare même lorsque les vers sont nourris avec de la feuille de mûrier vaporisée avec du Kohiko Silcare au cours d'un ou deux repas. Il est intéressant de constater que la vaporisation de ce produit à tous les repas est plus efficace que la vaporisation en une ou deux doses. L'autre aspect important de cette expérience est que l'humidité de la feuille n'a pas d'effet néfaste sur la croissance du ver à soie et les caractères du cocon, ce qui est souvent une crainte des éleveurs. Ce type de nutrition foliaire est plus sûr et non nuisible à l'environnement ; ce type de nutrition foliaire est peut-être de nature révolutionnaire et a besoin d'être confirmé par une démonstration à un échelon plus important au niveau des fermiers.

## COMPARATIVE ASSESSMENT OF CERTAIN BED DISINFECTANTS IN CONTAINING THE MAJOR DISEASES IN TASAR SILKWORM, *ANTHEREA MYLITTA* D.

ALOK SAHAY, G. P. SINGH, D. K. ROY & B. R. R. P. SINHA

Central Tasar Research & Training Institute, Piska Nagri, Ranchi – 835 303, India.  
(E-mail :aloksaysbranchi@rediffmail.com)

*A comparative evaluation of four bed disinfectants was done for containing the spread of major diseases of tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. Healthy silkworms were reared in indoor condition, then a fixed number of silkworm larvae inoculated with different diseases i.e. bacteriosis, virosis, muscardine and pebrine were introduced in that rearing separately as a constant source of contamination. Thereafter, four bed disinfectants were dusted on the body of the silkworm larvae as well as rearing bed separately. Mortality percentage of the silkworm larvae in each treatment was recorded in order to assess the efficacy of the different disinfectants in containing the spread of different diseases.*

*All the disinfectants tested showed a significant difference against controls, however, treatment with tasar keet ousadh (T. K. O) performed best in containing the spread of virosis (13.21%), bacteriosis (16.22 %) and muscardine (7.10%) disease, followed by the treatments with Vijeytha. The results of the study suggest the use of bed disinfectants in order to control the contamination during rearing.*

**Keywords:** Bed disinfectants, tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D.

### INTRODUCTION

Tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. is a holometabolous, poikilothermic insect reared generally in outdoor conditions on *Terminalia arjuna* and *T. tomentosa* food plants. Since larvae cannot regulate their body temperature they are very much susceptible to viral, bacterial, fungal and protozoan diseases. These diseases are the major constrain in tasar culture, which adversely affect the economics of this culture by causing 35-40% crop loss (Jolly *et al.*, 1974). During rearing, silkworm larvae possibly get infected either through contaminated leaf or through other sources of contamination (Baig *et al.*, 1990). Infected silkworms spread the disease to healthy silkworms either through vomit, excreta, haemolymph or direct contact. Various curative measures have been tried so far but no one has shown very effective results, hence, prophylactic measures are the only way to contain the outbreak of these diseases.

The use of bed disinfectants during rearing is the common prophylactic measure in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* and the eri silkworm, *Philosamia ricini* but in the tasar silkworm, *A. mylitta* other disinfectants are frequently used due to the different nature of rearing. In *A. mylitta*, Asiphor and sodium hypochlorite have been used for the control of bacteriosis and virosis (Bansal *et al.*, 1996). Hydrochloric acid has been used for the control of microsporidiosis in tasar silkworm (Shukla *et al.*, 1994). Thangavelu *et al.*, (1995) used various chemicals as disinfectants for the control of different diseases in the tasar silkworm.

Bhattacharya *et al.*, (1995), Patil and Sharadamma (1999), Datta *et al.*, (1998) and Samson *et al.*, (1998) used disinfectants like Labex, Sanjeevani, Vijeyta, Resham Jyoti, on *B. mori* respectively. Out of these disinfectants some have a broad-spectrum effect whereas others have specific effects on particular diseases. However, the use of bed disinfectants on *A. mylitta* is very much restricted. Hence, a present study was designed to determine the effect of four bed disinfectants i. e., Vijeyta, trade name "Vetcare" sericare division of Ashchem agrotech ltd., Bangalore, Resham Jyoti manufactured by Durga biotech, Bangalore, Sanjeevani (produced by Karnataka state sericulture Research and Development Institute, Bangalore, India) and Tasar Keet Ousadh (T. K. O.), a chemical formulation (produced by Central Tasar & Training Institute, Ranchi, India), against the spread of various diseases in tasar silkworm, *A. mylitta*.

## MATERIALS AND METHODS

Newly hatched disease free larvae of popular "Daba" bivoltine ecorace were reared on the leaves of food plants *Terminalia arjuna*. Four replications of 100 larvae each were maintained for each treatment. The entire experiment was conducted in a hygienic indoor rearing room following the standard practice of rearing (Bania *et al.*, 1992). Bed disinfectants, Vijeyta, Resham Jyoti, Sanjeevani were procured from the market whereas Tasar Keet Ousadh (T. K. O.) was prepared by mixing slaked lime, paraformaldehyde and benzoic acid in the ratio of 97.5:0.5:2.

In order to infect silkworms, four larvae from each replication were taken out in the second instars and inoculated with Nosema sp. ( $1 \times 10^7$  spores / ml), AmCPV ( $1 \times 10^7$  POBS / ml), *Penicillium citrinum* ( $1 \times 10^7$  conidia / ml) and *Bacillus* sps. Bacteria ( $1 \times 10^7$  cells / ml) as causative agents for pebrine, virosis, muscardine and bacteriosis. 0.10 ml inoculum of different pathogens was used for four larvae each. The pathogens of the respective disease were used from the stock maintained in silkworm pathology laboratory of Central Tasar Research & Training Institute, Ranchi. The inoculations were given before resumption of feeding after second moult by smearing the inoculum suspension evenly on Arjuna leaf (as a first feed in third instar) then the inoculated larvae were introduced among healthy of respective lot.

Introduction of diseased larvae in all treatments ensured the regular source of contamination to the healthy larvae then the treatment with different bed disinfectants were given to them. In one lot after introduction of diseased larvae in healthy silkworms no disinfectants were applied, it acted as inoculated control batch whereas in another lot after introduction of diseased larvae, bleaching powder was applied, it acted as treated control batch for comparing the results with other treated lots.

The bed disinfectants were dusted once during each instar over the body of silkworm as well as on their rearing bed, half an hour before resuming first feed, by using fresh muslin cloth. During first, second and third instars bed disinfectants were applied at the rate of 40 g / sq meter of rearing bed area and during fourth and fifth instars dusting was done at the rate of 70.5 g / sq. meter.

The entire experiment was designed in Complete Randomized Design (C. R. D.) pattern (Gomez *et al.*, 1984) and conducted during July – August and repeated during Sept.-November silkworm rearing crops. The observations on the mortality due to virosis, bacteriosis, muscardine and pebrine in each treatment, according to replication, were recorded and analysed statistically. Analysis of variance was carried out to study the treatment variation and experimental error. For evaluation of all possible pairs of treatment means Duncan's multiple range (DMRT) was applied.

## RESULTS AND DISCUSSION

The data presented in Table I show the efficacy of different bed disinfectants against virosis, pebrine, bacteriosis and muscardine of tasar silkworm. Among the tested disinfectants the treatments with T. K. O. resulted in minimum virosis (C. P. V.) infection (13.21%) followed by the treatment with Vijeytha (17.36%). The treatments with T. K. O., Resham Jyoti, were significantly different

( $P < 0.05$ ) from each other in reducing the spread of disease. However, Vijetha and Sanjeevani were significantly ( $P < 0.05$ ) different from each other but comparable with other treatments. Whereas all treatments were significantly ( $P < 0.05$ ) different with both controls. The efficacy of different bed disinfectants on checking the spread of pebrine disease is depicted in Table I, the data indicated that the minimum infection (8.24%) of pebrine disease was observed in the treatment with Vijeyta followed by the treatment of T. K. O. (10.62%). Among treatments all were significantly ( $P < 0.05$ ) different from inoculated control except treatment with Sanjeevani which was significantly different with other treatments but at par with treated control.

Results of various treatments against bacteriosis disease, which are presented in Table I, indicated that the disease infection percentage was minimum (16.22 %) in the treatment with T.KO followed by the treatment of Vijeytha (21.00%) and the least efficacy (31.23%) was observed in the treatment with Sanjeevani. Among treatments, all treatments were significantly ( $P < 0.05$ ) different from each other as well as from both controls.

**Table I. DMRT for comparing all possible pairs of infection means, from a CRD experiment involving six treatment using the alphabet notations.**

*Tableau I. DMRT pour comparer tous les couples possibles de moyennes d'infestation, à partir d'une expérience CRD comprenant six traitement en utilisant des notations avec l'alphabet.*

| Treatment                                   | CPV<br>Infection (%)                      | Pebrine<br>infection (%)                      | Bacterial<br>infection (%)                 | Muscardine<br>infection (%)                      |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <i>Traitement</i>                           | <i>Infestation<br/>par le CPV<br/>(%)</i> | <i>Infestation par<br/>la pébrine<br/>(%)</i> | <i>Infestation<br/>bactérienne<br/>(%)</i> | <i>Infestation par<br/>la muscardine<br/>(%)</i> |
| T. K. O.                                    | 13.21 <sup>c</sup>                        | 10.62 <sup>bc</sup>                           | 16.22                                      | 7.10 <sup>b</sup>                                |
| Vijetha                                     | 17.36 <sup>bc</sup>                       | 8.24 <sup>c</sup>                             | 21.00                                      | 9.34 <sup>ab</sup>                               |
| Resham Jyoti                                | 20.14 <sup>ab</sup>                       | 13.54 <sup>b</sup>                            | 27.16                                      | 11.42 <sup>a</sup>                               |
| Sanjeevani                                  | 24.22 <sup>a</sup>                        | 19.31 <sup>a</sup>                            | 31.24                                      | 20.12                                            |
| Treated control<br><i>Témoin traité</i>     | 48.96                                     | 20.68 <sup>a</sup>                            | 60.93                                      | 60.49                                            |
| Inoculated control<br><i>Témoin inoculé</i> | 84.11                                     | 24.30                                         | 86.40                                      | 93.15                                            |

Subscript alphabets indicated DMRT test / *Les lettres en exposant indiquent le test DMRT.*

Any two means having a common alphabets are not significantly different at 5% level of significance / *Deux moyennes ayant des lettres communes ne présentent pas une différence significative au seuil de signification de 5 %.*

**Tableau II. Economics of different bed disinfectants per 100 larvae.****Tableau II. Bilan économique des différents désinfectants de litières pour 100 larves.**

| Dusting<br>Schedule                                                               | Space<br>required<br>in rearing<br>(sq. mt)                         | Qty<br>required@<br>of (g)            | Total<br>quantity (g)              |                              |                                     |                             |                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| <i>Calendrier<br/>de<br/>saupoudrage</i>                                          | <i>Espace<br/>nécessaire<br/>pour l'élevage<br/>(m<sup>2</sup>)</i> | <i>Qté<br/>nécessaire<br/>par (g)</i> | <i>Quantité<br/>totale<br/>(g)</i> |                              |                                     |                             |                         |
| Before brushing<br>in empty tray<br><i>Avant la levée dans<br/>une claie vide</i> | 1.5                                                                 | 20                                    | 30                                 |                              |                                     |                             |                         |
| After I moult<br><i>Après la 1<sup>ère</sup> mue</i>                              | 0.3                                                                 | 40                                    | 12                                 |                              |                                     |                             |                         |
| After II moult<br><i>Après la 2<sup>ème</sup> mue</i>                             | 0.3                                                                 | 40                                    | 12                                 |                              |                                     |                             |                         |
| After III moult<br><i>Après la 3<sup>ème</sup> mue</i>                            | 0.9                                                                 | 40                                    | 36                                 |                              |                                     |                             |                         |
| After IV moult<br><i>Après la 4<sup>ème</sup> mue</i>                             | 1.2                                                                 | 70.5                                  | 84.6                               |                              |                                     |                             |                         |
| After V moult<br><i>Après la 5<sup>ème</sup> mue</i>                              | 1.5                                                                 | 70.5                                  | 105.75                             | Vijeytha<br>@ \$ 0.68<br>/kg | Resham<br>Jyoti<br>@ \$ 0.57<br>/kg | Sanjeevani<br>@ 0.45<br>/kg | T.K.O<br>\$ 0.22<br>/kg |
| <b>Total</b>                                                                      | <b>5.7</b>                                                          | <b>281</b>                            | <b>280.35</b>                      | <b>\$ 0.20</b>               | <b>\$ 0.16</b>                      | <b>\$ 0.13</b>              | <b>\$ 0.066</b>         |

The data pertaining to muscardine disease are presented in Table I indicated that the minimum disease infection (7.10%) was observed in the treatment with T.K.O. followed by Vijeytha (9.34%), Resham Jyoti (11.42%) and Sanjeevani (20.12%). All treatments were significantly different ( $P < 0.05$ ) from Sanjeevani, inoculated control and treated control.

The treatment with T.K.O. was the most effective in checking the spread of all diseases except pebrine disease, followed by the treatments of Vijeytha. The present observations are in accordance to Thangavelu *et al.*, (1995) also reported better effect of T.K.O. in containing the spread of diseases than other disinfectants. The treatment with Vijeyta was only next to T.K.O., because the efficacy of this bed disinfectant is equally effective for all silkworm diseases (Datta *et al.*, 1998). Sanjeevani is the bed disinfectant specially recommended for grasserie and flacherie diseases of *Bombyx mori* (Patil *et al.*, 1999), however it was not much effective in reducing the disease mortality in *A. mylitta* as

compared to T.K.O. and Vijetytha. Although Resham Jyoti is a broad-spectrum bed disinfectant (Samson *et al.*, 1998) did not perform as effectively as T.K.O. and Vijeytha in case of *A. mylitta*.

The silkworm rearing beds are more humid than the rearing environment, when the bed disinfectants are dusted, they reduced the humidity of the bed by absorbing the moisture because of their hygroscopic nature and enhanced drying of the bed by their exothermal reaction with the available moisture (Prasad *et al.*, 1999). Further, the high pH of the disinfectants inactivates the available pathogens of the silkworm rearing resulting in disease reduction.

Keeping in view the cost effectively (\$ 0.066 / 100 larvae) and its ability to control major diseases of tasar silkworm, T. K. O. should be given an edge over other bed disinfectants (Table II).

## REFERENCES

- BAIG M., NATARAJU B. & SAMSON M. V. (1990) Studies on the effect of antibiotics on rearing performance and loss due to diseases in silkworm, *Bombyx mori*, Indian. Journ. Of Seric., 29(1): 54-59.
- BANSAL A. K., SHUKLA R. M., ROY D. K., SAXENA N. N., GOEL A. K., SINHA B. R. R. P., SINHA S. S. (1996) Efficacy of Asiphor and Sodium hypochlorite in controlling diseases of the tasar silkworm, *Antheraea mylitta* Drury. Bull. Sericult. Res. 7, 45-48.
- BANIA H. R., BAJPAYE C. M., & REDDY K. D. (1992) Indoor rearing technique of *Antheraea mylitta* D. Annual Report, CTR&TI, Ranchi pp. 18.
- BHATTACHARYA KRISHNAN J. N., CHANDRA A. K., SEN S. K., SARATCHANDRA B. (1995) LABEX: An effective bed disinfectant. Indian Silk, 29, 43-44.
- DATTA R. K., BAIG M., NATARAJU B., BALAVENKATASUBBIAH M., SELVAKUMAR T. (1998) Vijeytha: An effective disinfectant. Indian Silk, 36, 12-13.
- GOMEZ A., KWANEHAL, GOMEZ A., ARTURO (1984) Statistical procedures for agricultural research, 2<sup>nd</sup> edition, A. Wiley Inter-science publication, John Wiley and sons, Singapore, 8-13.
- JOLLY M. S., SEN S. K., AHSAN M. M. (1974) Tasar culture. Central Silk Board, Bombay. P. 183.
- PATIL C. S. & SHARADAMMA P. (1999) Sanjeevani: An effective bed disinfectant. Indian Silk, 37, 13-14.
- PRASAD N. R. (1999) Lime and its application in silkworm disease management. Indian Silk 38, 12-14.
- SAMSON M. V., SINGH R. N., SASIDHARAN T. O. (1998) Resham Jyoti A wide spectrum bed disinfectant. Indian Silk, 37, 9-10.
- SUKLA R. M., BANSAL A. K., SAXENA N. N., GRIYACHE U. P., THANGAVELU K. (1994) Effect of hydrochloric acid treatment on microsporidiosis in *Antheraea mylitta* D. (Saturniidae : Lepidoptera) Indian J. Seri. 33(1), 59-61.
- THANGAVELU K., BANSAL A. K., SHUKLA R. M., SAXENA N. N., JAYASWAL J., GOEL A. K. (1995) Evaluation of some chemicals for prevention of disease in tasar silkworm *Antheraea mylitta* Drury (Lepidoptera : Saturniidae) Indian J. Seri. 34(2), 142-144.

## EVALUATION COMPARATIVE DE CERTAINS DESINFECTANTS DE LITIÈRE POUR LUTTER CONTRE LES PRINCIPALES MALADIES DU VER À SOIE TASAR, *ANTHEREA MYLITTA* D.

ALOK SAHAY, G. P. SINGH, D. K. ROY & B. R. R. P. SINHA

Central Tassar Research & Training Institute, Piska Nagri, Ranchi – 835 303, Inde  
(E-mail : aloksahaycsbranchi@rediffmai.com)

Nous avons procédé à une évaluation comparative de quatre désinfectants de litière pour lutter contre la propagation des principales maladies du ver à soie tassar, *Antheraea mylitta* D. Les vers à soie sains sont élevés à l'intérieur, puis un nombre fixe de larves de vers à soie est inoculé avec différentes maladies, c'est à dire la bactériose, la virose, la muscardine et la pébrine qui sont introduites dans cet élevage séparément comme une source constante de contamination. Puis on saupoudre quatre désinfectants de litière sur le corps des larves de ver à soie ainsi que dans la litière. On enregistre le pourcentage de mortalité des larves de vers à soie avec chaque traitement pour évaluer l'efficacité des différents désinfectants à contenir la propagation des différentes maladies.

Tous les désinfectants testés présentent une différence importante par rapport aux témoins, cependant le traitement avec du Tassar Keet Ousadh (T.K.O.) donne les meilleurs résultats pour freiner la propagation de la virose (13,21 %), de la bactériose (16,22 %) et de la muscardine (7,10 %), suivi par les traitements avec du Vijeythat. Compte tenu des résultats de l'étude, on conseille l'utilisation de désinfectants de litière pour lutter contre la contamination pendant l'élevage.

### INTRODUCTION

Le ver à soie tassar, *Antheraea mylitta* D. est un insecte holométabole, poïkilotherme, élevé en général à l'extérieur sur les plantes hôtes *Terminalia arjuna* et *T. tomentosa*. Puisque les larves ne peuvent pas réguler la température de leur corps, elles sont très sensibles aux maladies virales, bactériennes, fongiques et aux protozoaires. Ces maladies sont la principale contrainte de l'élevage du tassar ; elles ont un effet adverse sur l'économie de cet élevage en provoquant une perte de récolte de l'ordre de 35 à 40 % (Jolly et coll., 1974). Au cours de l'élevage, les larves de ver à soie sont probablement infestées par des feuilles contaminées ou par d'autres sources (Baig et coll., 1990). Les vers à soie infestés propagent la maladie aux vers à soie sains soit par le vomis, les excréments, l'hémolymphe ou le contact direct. On a essayé des mesures curatives variées mais aucune ne donne de résultats très efficaces jusqu'à présent, et les mesures prophylactiques sont le seul moyen de contenir l'éruption de ces maladies.

L'utilisation de désinfectants de litière est une mesure prophylactique courante chez le ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* et le ver à soie eri, *Philosamia ricini*, mais chez le ver à soie tassar *A. mylitta*, on utilise fréquemment d'autres désinfectants compte tenu de la nature différente de l'élevage. Chez *A. mylitta*, on utilise l'Asiphor et l'hypochlorure de sodium pour lutter contre la bactériose et la virose (Bandal et coll., 1996). L'acide hydrochlorique a été utilisée chez le ver à soie tassar pour lutter contre la microsporidiose (Shukla et coll., 1994). Thangavelu et coll., (1995) ont utilisé des produits chimiques variés comme désinfectants pour lutter contre les différentes maladies du ver à soie tassar.

Bhattacharya et coll., (1995), Patil et Sharadamma (1999), Datta et coll., (1998) et Samson et coll., (1998) ont utilisé respectivement des désinfectants comme le Labex, le Sanjeevani, le Vijeyta, le Resham Jyoti, chez *B. mori*. Parmi ces désinfectants, certains ont un effet général tandis que d'autres ont des effets spécifiques sur des maladies particulières. Cependant, l'utilisation de désinfectants de litière chez *A. mylitta* est très restreinte. Nous avons donc entrepris cette étude pour déterminer l'effet de quatre désinfectants de litière, c'est à dire le Vijeyta, nom de marque " Vetcare " Service Sericare d'Ashchem Agrotech Ltd., à Bangalore, le Resham Jyoti fabriqué par Durga Biotech, à Bangalore, le Sanjeevani (produit par le *Karnataka State Sericulture Research and Development Institute*, à Bangalore, en Inde) et le Tasar Keet Ousadh (T.K.O.), une formulation chimique produite par le *Central Tasar & Training Institute*, à Ranchi, en Inde contre la propagation de maladies variées chez le ver à soie tasar, *A. mylitta*.

## MATERIELS ET METHODES

On élève les larves saines venant d'éclore de l'écovore bivoltine populaire " Daba " sur les feuilles des plantes hôtes *Terminalia arjuna*. On maintient quatre répétitions de 100 larves pour chaque traitement. On réalise l'expérience entière dans une pièce d'élevage hygiénique en suivant la pratique d'élevage habituelle (Bania et coll., 1992). On se procure les désinfectants de litière, le Vijeyta, le Resham Jyoti, le Sanjeevani sur le marché tandis qu'on prépare le Tasar Keet Ousadh (T.K.O.) en mélangeant de la chaux, de la paraformaldéhyde et de l'acide benzoïque dans un ratio de 97 : 5 : 0.5 : 2.

Pour infester les vers à soie, on prend quatre larves du deuxième âge dans chaque répétition et on les inocule avec *Nosema* sp. ( $1 \times 10^7$  spores / ml), AmCPV ( $1 \times 10^7$  POBs / ml), *Penicillium citrinum* ( $1 \times 10^7$  spores / ml) et avec les bactéries *Bacillus* sps. ( $1 \times 10^7$  cellules / ml) comme agents responsables de la pébrine, de la virose, de la muscardine et de la bactériose. On utilise 0,10 ml d'inoculum de chacun des différents pathogènes pour quatre larves de chaque répétition. On utilise les pathogènes de la maladie respective à partir du stock maintenu au Laboratoire de Pathologie du ver à soie du *Central Tasar Research & Training Institute*, à Ranchi. On procède aux inoculations avant la reprise de l'alimentation après la deuxième mue en répandant également la suspension de l'inoculum sur la feuille d'Arjuna (comme premier repas au troisième âge) puis on introduit les larves inoculées chez les larves saines du lot respectif.

On saupoudre les désinfectants de litière sur le corps des vers à soie ainsi que dans leur litière une fois pendant chaque âge, une demi-heure avant la prise du premier repas, en utilisant un tissu de mousseline fraîche. Pendant le premier, le deuxième et le troisième âge, on applique les désinfectants de litière au taux de 40 g / m<sup>2</sup> de surface de litière et pendant le quatrième et le cinquième âge on procède au saupoudrage au taux de 70,5 g / m<sup>2</sup>.

Toute l'expérience est conçue selon une Conception Complètement Aléatoire (C.R.D.) (Gomez et coll., 1984) et réalisée en juillet –août et répétée pendant les récoltes d'élevage du ver à soie de sept-novembre. On enregistre et on analyse statistiquement les observations sur la mortalité due à la virose, la bactériose, la muscardine et la pébrine pour chaque traitement selon la répétition. On réalise l'analyse de variance pour étudier la variation des traitements et l'écart expérimental. Pour l'évaluation de tous les couples possibles de traitement, on applique le Test Multiple de Duncan (DMRT).

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les données présentées dans le Tableau I montrent l'efficacité des différents désinfectants de litière contre la virose, la pébrine, la bactériose et la muscardine du ver à soie tasar. Parmi les désinfectants testés, les traitements avec du T.K.O entraînent un minimum d'infestation par la virose (CPV) (13,21 %), suivi par le traitement avec du Vijeytha (17,36 %). Les traitements avec du T.K.O.,

du Resham Jyoti ont des effets significativement différents ( $P < 0,05$ ) sur la propagation de la maladie. Vijeytha et Sanjeevani sont significativement différents ( $P < 0,05$ ) l'un de l'autre mais comparables avec les autres traitements. Tous les traitements ont des effets significativement ( $P < 0,05$ ) différents par rapport aux deux témoins. L'efficacité des différents désinfectants de litière lorsqu'on vérifie la propagation de la maladie de la pébrine est présentée dans le Tableau I, les données montrent que l'on observe l'infestation minimum (8,24 %) par la maladie de la pébrine avec le Vijeyta suivi par le traitement avec du T.K.O. (10,62 %). Parmi, les traitements, tous sont significativement différents ( $P < 0,05$ ) du témoin inoculé sauf Sanjeevani qui est significativement différent des autres traitements mais à égalité avec le témoin traité.

Les résultats des traitements variés contre la bactériose, qui sont présentés dans le Tableau I, montrent que le pourcentage d'infestation est minimum (16,22 %) en utilisant le T.K.O. suivi par Vijeytha (21 %) et le moins efficace est Sanjeevani. Les effets de tous les traitements sont considérablement ( $P < 0,05$ ) différents les uns des autres et des deux témoins.

Les données concernant la maladie de la muscardine qui sont présentées dans le Tableau I montrent que l'on observe l'infestation minimum par la maladie (7,10 %) en utilisant le traitement avec du T.K.O. suivi par le Vijeytha (9,34 %), le Resham Jyoti (11,42 %) et Sanjeevani (20,12 %). Tous les traitements sont très différents ( $P < 0,05$ ) de Sanjeevani, du témoin inoculé et du témoin traité.

Le traitement avec du T.K.O. est le plus efficace pour enrayer la propagation de toutes les maladies sauf la maladie de la pébrine, suivi par Vijeytha. Ces observations sont en accord avec celles de Thangavelu et coll., (1995) qui ont aussi rapporté un meilleur effet du T.K.O. pour contenir la propagation des maladies par rapport aux autres désinfectants. Le traitement avec du Vijeyta se classe après le T.K.O. parce que ce désinfectant de litière est aussi efficace chez toutes les maladies du ver à soie (Datta et coll., 1998). Sanjeevani est le désinfectant de litière spécialement recommandé pour les maladies de la grasserie et de la flacherie chez *Bombyx mori* (Patil et coll., 1999) cependant il n'est pas très efficace pour diminuer la mortalité provoquée par la maladie chez *A. mylitta* par comparaison au T.K.O. et au Vijeytha. Bien que le Resham Jyoti soit un désinfectant de litière à effet général (Samson et coll., 1998) il n'est pas aussi efficace que le T.K.O. et que le Vijeytha chez *A. mylitta*.

Les litières d'élevage sont plus humides que l'environnement d'élevage ; lorsqu'on saupoudre des désinfectants de litière, ils diminuent l'humidité de la litière en absorbant l'humidité grâce à leur nature hygroscopique et augmentent l'assèchement de la litière par leur réaction exothermique avec l'humidité disponible (Prasad et coll., 1999). De plus, le pH élevé des désinfectants désactive les pathogènes présents dans l'élevage du ver à soie en entraînant une diminution de la maladie.

Compte tenu de sa rentabilité (0,066 \$ / 100 larves) et de sa capacité à lutter contre les principales maladies du ver à soie, on devrait préférer le T.K.O. aux autres désinfectants (Tableau II).

## STUDIES ON SEED (EGG) PRODUCTION WITH REFERENCE TO MATING BEHAVIOUR OF MUGA SILKWORM, *ANTHRAEA ASSAMA* WESTWOOD\*

INDRAJIT BISWAS & NILAY RAY

Muga Research Laboratory, A.B.N. Seal College, Cooch Behar - 736101- West Bengal, India

*The experiment was conducted in Muga Research Laboratory, A.B.N. Seal College, Cooch Behar to overcome the constraints regarding seed (egg) production of Muga silkworm *Antheraea assama* Ww. through manipulating their mating behaviour to standardize the mating hours and utilisation of male moth for more than one time for better supply of quality seed to farmers. Mating duration of 7 hours showed highest fecundity and hatching. Utilisation of male moth up to 3 times during March-April and up to 4 times during Sept.- Oct. had no harmful effect on fecundity as well as hatching. It could be suggested that 7 hours mating would be optimum and the same male moth could be utilised up to three / four times without any hampering effect on egg production and hatching for better supply of eggs to the farmers for muga culture.*

**Keywords:** Muga silkworm, egg laying, egg retention, hatching, repeated mating

### INTRODUCTION

Muga Silkworm (*Antheraea assama* Ww.) is a highly heterogeneous, unique and semi-domesticated strain of Saturniidae endemic to Assam, adjacent foothills of Meghalaya, Nagaland, Arunachal Pradesh and Mizoram. Exploration of Muga culture in Terai region of West Bengal particularly in Cooch Behar and Jalpaiguri districts having contiguity with Assam faces problems related to supply of egg. Production of large number of eggs for farmers is a serious problem in Assam (Sahu *et al.*, 1998). Uneven sex-ratio, poor seed cocoon and its preservation and asynchronous moth emergence resulting in poor mating and poor number of egg production are the principal constraints other than environmental stresses (Samson and Barah, 1989). Though works related to male-female ratio and seed cocoon production through improvement of rearing technology are in progress (Annual Report, RMRS, CSB, Boko, Assam, 1997), efforts to overcome asynchronous moth emergence to ensure higher mating percentage leading to higher fecundity is very limited in muga silkworm and the approach is only to synchronise male and female through short-time preservation (Khanikor and Dutta, 1989). In mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.), some works have been attempted by exploiting male moths for more than one time to overcome the sex ratio problem as well as asynchronous moth emergence (Benchamin *et al.*, 1990). In Tasar silkworm (*Antheraea milita*) repeated mating has been adopted as practice (Ojha *et al.*, 1996). In the present investigation, an attempt has been made to overcome the constraints in muga silkworm through manipulating their mating behaviour to standardize the mating hours and utilisation of male moth for more than one time for better supply of quality seed to the farmers.

\* (Paper presented at 90<sup>th</sup> Indian Science Congress, Bangalore, 3 – 7<sup>th</sup> January, 2003.)

## MATERIALS AND METHODS

Seed cocoons were collected from Extension Centre (Cooch Behar, West Bengal), Regional Muga Research Station, Central Silk Board and the experiment was conducted thrice during 2001-2002 in muga research laboratory, A.B.N. Seal College, Cooch Behar. Eleven (11) treatments for standardisation of mating hours were selected from 2 hours to 12 hours with one hour interval, egg laying and retention were taken as quantity production parameters and hatching number and percentage were taken as quality production. Subsequently in another experiment males were exploited up to a maximum of 6 times during Sept.-Oct. and four times during March-April with fresh female and egg laying, retention and hatchability were taken as key parameters. All data collected were analysed statistically.

## RESULTS

**a. Effect of different mating hours on egg laying and hatching:**

No significant differences were observed between different mating hours on egg laying, retention and hatching. However, highest fecundity was observed when mating was allowed for seven hours (287), lowest being from 12 hours (250). Egg retention was nearly nil to 11 hours. Number of egg hatched was highest from seven hours (284) which was 99.19%, lowest being from 12 hours which was 235 and 94% for egg laying and hatching respectively (Table I).

**Table I. Data on egg laying and hatching as influenced by different mating hours.**

*Tableau I. Données sur la ponte et l'éclosion sous l'influence de différentes heures d'accouplement.*

| Mating Hours             | Egg laying<br>(no.)                        | Egg Retention<br>(no.)                     | Hatching<br>(no.)                          | Hatching<br>percentage<br>(%)              |
|--------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Heures<br>d'accouplement | Ponte<br>des œufs<br>(nbre)                | Rétention<br>d'œufs<br>(nbre)              | Éclosion<br>(nbre)                         | Pourcentage<br>d'éclosion<br>(%)           |
| 2 hrs.                   | 267                                        | 10                                         | 253                                        | 95                                         |
| 3 hrs.                   | 269                                        | 9                                          | 265                                        | 99                                         |
| 4 hrs.                   | 273                                        | 9                                          | 266                                        | 97                                         |
| 5 hrs.                   | 280                                        | 6                                          | 277                                        | 99                                         |
| 6 hrs.                   | 279                                        | 6                                          | 273                                        | 98                                         |
| 7 hrs.                   | 287                                        | 2                                          | 285                                        | 99                                         |
| 8 hrs.                   | 276                                        | 8                                          | 267                                        | 97                                         |
| 9 hrs.                   | 273                                        | 5                                          | 266                                        | 97                                         |
| 10 hrs.                  | 252                                        | 4                                          | 250                                        | 99                                         |
| 11 hrs.                  | 251                                        | 3                                          | 247                                        | 98                                         |
| 12 hrs.                  | 250                                        | 6                                          | 235                                        | 94                                         |
| CD at 5%                 | Non-Significant<br><i>Non significatif</i> | Non-Significant<br><i>Non significatif</i> | Non-Significant<br><i>Non significatif</i> | Non-Significant<br><i>Non significatif</i> |

**Table II. Data on grainage performance as influenced by repeated mating during March-April.****Tableau II. Données sur la performance de grainage sous l'influence d'un accouplement répété en mars – avril.**

| Treatment                                                                              | Egg laying<br>(no.)       | Egg Retention<br>(no.)        | Hatching<br>(no.)  |
|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Traitements                                                                            | Ponte<br>d'œufs<br>(nbre) | Rétention<br>d'œufs<br>(nbre) | Éclosion<br>(nbre) |
| Fresh male × fresh female<br><i>Nouveau mâle × nouvelle femelle</i>                    | 232                       | 7                             | 231                |
| Single mated male × fresh female<br><i>Mâle accouplé une fois × nouvelle femelle</i>   | 207                       | 7                             | 197                |
| Double mated male × fresh female<br><i>Mâle accouplé deux fois × nouvelle femelle</i>  | 194                       | 15                            | 164                |
| Triple mated male × fresh female<br><i>Mâle accouplé trois fois × nouvelle femelle</i> | 75                        | 140                           | 0                  |
| C.D. at 5% / DC à 5 %                                                                  | 3                         | 9                             | 4                  |

**b. Effect of number of matings utilising single male moth on egg laying and hatching:**

Results obtained from repeated mating during March-April were depicted in Table II and that of during September-October in Table III.

During March-April:

During March-April, prior to second commercial crop rearing period i.e. April-May one male moth could be forced to couple with fresh female up to four times.

Egg laying:

Significant variations observed between the treatments. Highest egg laying was recorded when fresh male and female moths were coupled (232). A decreasing trend was observed from second time utilization to 4<sup>th</sup> time utilization of the same male moth. There observed significant variation in egg laying between second (207) and third time (194) exploitation of the same male moth. But significantly abrupt decreased egg laying was observed when extreme utilization of male moth for the fourth time was done (75).

Egg Retention:

Egg retention was not significantly higher inside the female body up to 3<sup>rd</sup> time utilization of a single male (7 to 15). But the egg retention in the female body when coupled with a male utilising for the 4<sup>th</sup> time was very high (140) which was even nearly double than the egg laid by that female.

**Table III. Data on grainage performance as influenced by repeated mating during September-October.****Tableau III. Données sur la performance de grainage sous l'influence d'un accouplement répété en septembre – octobre.**

| Treatment                                                                              | Egg laying<br>(no.)    | Egg retention<br>(no.)     | Hatching<br>(no.)  |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------|
| Traitement                                                                             | Ponte d'œufs<br>(nbre) | Rétention<br>d'œufs (nbre) | Éclosion<br>(nbre) |
| Fresh male × fresh female<br><i>Nouveau mâle × nouvelle femelle</i>                    | 264                    | 6                          | 262                |
| Single mated male × fresh female<br><i>Mâle accouplé une fois × nouvelle femelle</i>   | 252                    | 12                         | 247                |
| Double mated male × fresh female<br><i>Mâle accouplé deux fois × nouvelle femelle.</i> | 254                    | 7                          | 249                |
| Triple mated male × fresh female<br><i>Mâle accouplé trois fois × nouvelle femelle</i> | 248                    | 16                         | 244                |
| Tetra mated × fresh female<br><i>Accouplé quatre fois × nouvelle femelle</i>           | 237                    | 25                         | 198.               |
| Penta mated male × fresh female<br><i>Mâle accouplé cinq fois × nouvelle femelle</i>   | 136                    | 125                        | 0                  |
| <b>C.D. at 5% / D. C. à 5 %</b>                                                        | <b>7</b>               | <b>5</b>                   | <b>6</b>           |

**Hatching:**

Number of hatched egg was significantly highest (231) from the egg laid by the female coupled with fresh male. The number of hatched egg recorded was 197 and 164 from the egg laid by the females repeatedly utilization of males for 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> times, respectively. Most striking observation was that no egg was hatched when the female mated with the male utilising for the fourth time.

**During September-October:**

During September-October- prior to main commercial rearing i.e. October-November one male moth could be exploited up to 6<sup>th</sup> time to mate with the fresh females.

**Egg laying:**

Like March-April, during September-October also the egg laying was found significantly highest (264) when fresh female were coupled with fresh male. Eggs laid by the females mated with the males utilising for 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> time had non-significant variation among them (248– 254). Eggs laid by the females mated with the male exploited for the 5<sup>th</sup> time was significantly lower (237). But repeated utilization of the male moth for the 6<sup>th</sup> time with fresh female reflected very low egg laying (136).

**Egg retention:**

Egg retention was 6 to 16 inside the female body coupled with up to 4<sup>th</sup> time utilization of single male moth. Very huge amount of egg retention (125.00) was recorded inside the female body when mated with a male utilised earlier for the five times.

**Egg hatching:**

Significantly highest number of hatched eggs was observed by the eggs laid by the female when coupled with fresh male (262) followed significantly by the eggs laid by the female mated with the males for 2<sup>nd</sup> to 4<sup>th</sup> time (244–249). Number of hatched eggs decreased significantly in the eggs laid by the females mated by the male repeatedly used for the 5<sup>th</sup> time (199). Surprisingly no egg was hatched for the females when coupled with the male utilised for sixth time.

## DISCUSSION

Success of muga culture highly depends upon seed (egg). Lack of supply of quality seeds (high hatching) not only affects commercial rearing but also disappoints farmers who are trying to adopt the muga culture in the newly adopted area of extended muga culture in terai region of West Bengal. The two main commercial crop-rearing seasons are October–November and April–May. Success of grainage during March–April and September–October is the foremost task to ensure the supply of large quantity of quality seed during commercial rearing. Asynchronous moth emergence and less number of seed cocoon productions are the principal constraints regarding egg production. Repeated mating by exploiting the same male can help to overcome this problem. For this, the optimum hours of mating should be recorded. Therefore, in the first experiment, effect of different mating hours on egg laying and hatching have been recorded (Table I). Non-significant results obtained from mating hours reflects that up to 12 hours mating any duration from second hour is sufficient for successful fertilization and egg laying which confirms the observations of Samson and Barah (1989), according to whom 3–5 hours mating is sufficient. From this observation it can be suggested that minimum mating hours can be exploited and the decoupled male can be utilized for repeated mating. However, in practice mechanical injury may damage both the male and fertilized female during decoupling within 5 hours. Moreover, mating duration of 7 hours shows highest fecundity and hatching, though the differences with others are not significant. Therefore, mating duration of 7 hours can be suggested as optimum for successful mating, egg laying and hatching.

In the next experiment, repeated mating has been conducted exploiting the males for a maximum of four times during March–April (Table II) and of 6 times during September–October (Table III) because it has been reported that female fertility in silkworm depends upon their male mates (Sidhu *et al.*, 1967). During both the seasons- though potential fecundity of the female was nearly same, repeated mating changed the egg laying and hatching. From repeated mating exploiting males up to 4 times during March–April shows that utilization of male up to 3 times have no harmful effect on fecundity as well as hatching. During September–October also, no significant variation has been observed between the egg laying of females mated with males utilized for the 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> time and after that decreases significantly and hatching also decreases from single mating to 5<sup>th</sup> time mating. However, no egg hatched from 6<sup>th</sup> time utilization. So, utilization of male up to 4<sup>th</sup> time during this season is effective in terms of egg laying and hatching.

Both the results have clear conformity with Benchamin *et al.* (1990), according to them in *Bombyx mori* the fecundity is comparable in the first 4 matings but reduces in 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> mating and with Ojha *et al.* (1996) trying the repeated mating in *Antheraea mylitta* where they have been found that females lay eggs even when mated with 4 × males. Repeated mating lead to inadequate discharge of spermatid fluid and result in reduced fecundity (Sidhu *et al.*, 1967). This is also reflected in terms of reduced laying and fertility percentage in the present study. Earlier studies also indicate that viability of eggs is not affected significantly up to four matings of male moths (Subramanyam, 1982).

Therefore, in muga culture, as synchronization of male and female is one of the principal constraints of egg production, the problem can be overcome through repeated exploitation of male moth up to four times prior to main commercial crop rearing season and up to three times before second commercial rearing by artificial coupling for seven hours which will ultimately supply higher number of quality eggs to the farmers.

## ACKNOWLEDGMENT

The financial assistance provided by University Grants Commission, New Delhi in carrying out this research work is gratefully acknowledged

## REFERENCES

- BENCHAMIN K.V.; MAGADUM S.B. & SHIVASHANKAR N. (1990). Mating capacity of male moths of pure breeds and hybrids in silkworm *Bombyx mori* L. Indian J. Seric. 29(2) : 182-187.
- KHANIKOR D.P. & DUTTA S.K. (1998). Low temperature preservation of seed cocoons for delaying moth emergence in muga silkworm (*Antheraea assama* Westwood) (Lepidoptera Saturniidae). Proc. of The 3<sup>rd</sup> International Conference on Wild Silkmooths, Bhubeneshwar, Orissa, November 11-14.
- SAHU M.; MUKHERJEE P.K. & MONDAL T. (1998). Constraints during pre-seed crop rearing of *Antheraea assama* Ww. at seed rearers level in lower Assam. Proc. of The 3<sup>rd</sup> International Conference on Wild Silkmooths, Bhubeneshwar, Orissa, November 11-14.
- SAMSON M.V. BARAH A. (1989). Suggestion for Better Muga Seed Production. Indian Silk. June 1989, 15-16.
- SIDHU N.S.; SREENIVASAN R. & SHAMACHARY (1967). Fertility performance of female moths depends on their male moths. Indian J. Seric. 1(2) : 77-84.
- SUBRAMANYAM K. (1982). Studies on the effect of rest on the efficiency of male moths in relation to number of mating and occurrence of viable eggs in silkworm *B. mori*. L. STS dissertation submitted ICTRETS, C.S.R & T.I, Mysore, 14-15.
- OJHA N.G.; SHARAN S. K.; RAVIKUMAR G.; DUBEY O.P.; SINHA B.R.R.P. & SINHA S. S. (1996). Effect of refrigeration on mating efficiency of male moths of Tasar silkworm, *Antheraea mylitta* D. Indian J. Seric. 35(2) : 155-157.

## ETUDES SUR LA PRODUCTION D'ŒUFS EN FONCTION DU COMPORTEMENT D'ACCOUPLEMENT DU VER A SOIE MUGA, *ANTHERAEA ASSAMA* WESTWOOD\*

INDRAJIT BISWAS & NILAY RAY

Muga Research Laboratory, A. B. N. Seal College, Cooch Behar – 736 101, West Bengal, Inde.

*On a réalisé l'expérience au Laboratoire de Recherche du Muga, à l'A.B.N. Seal College à Cooch Behar pour surmonter les contraintes concernant la production d'œufs de grainage du ver à soie muga *Antheraea assama* Ww. par la manipulation de leur comportement d'accouplement pour standardiser les durées d'accouplement et utiliser le papillon mâle plus d'une fois pour un meilleur apport de graines de qualité aux fermiers. Une durée d'accouplement de 7 heures entraîne la fécondité et l'éclosion les plus élevées. L'utilisation du papillon mâle jusqu'à trois fois en mars-avril et jusqu'à 4 fois en sept – oct. n'a pas d'effet nuisible sur la fécondité ni sur l'éclosion. On peut suggérer qu'un accouplement de 7 heures est optimum et on pourrait utiliser le même papillon mâle jusqu'à trois / quatre fois sans gêner la production d'œufs et l'éclosion pour un meilleur apport d'œufs aux fermiers pour l'élevage du muga.*

### INTRODUCTION

Le ver à soie muga (*Antheraea assama* Ww.) est une souche très hétérogène, unique et semi-domestique de Saturniidae endémique à l'Assam, aux collines proches du Meghalaya, du Nagaland, de l'Arunachal Pradesh et du Mizoram. L'exploration de l'élevage du muga dans la région de Terai du Bengale ouest, en particulier dans les zones de Cooch Behar et de Jalpaiguri qui jouxtent l'Assam, révèle des problèmes de disponibilité en œufs. Dans l'Assam, les fermiers rencontrent des problèmes importants pour produire des œufs en grande quantité (Sahu et coll., 1998). En dehors des stress environnementaux, les principales contraintes sont un sex-ratio inégal, des cocons de grainage de mauvaise qualité, une mauvaise conservation et une émergence désynchronisée des papillons qui entraînent un mauvais accouplement et un faible nombre d'œufs pour la production (Samson et Barah, 1989). Bien que des travaux concernant le ratio mâle – femelle et la production de cocons de grainage grâce à l'amélioration de la technologie de grainage aient été entrepris (Annual Report, RMRS, CSB, Boko, Assam, 1997), les efforts pour faire face à l'émergence désynchronisée des papillons pour obtenir un pourcentage d'accouplement plus élevé et donc une fécondité plus élevée sont très limités chez le ver à soie muga et l'approche consiste seulement à synchroniser les mâles et les femelles grâce à une conservation à court terme (Khanikor et Dutta, 1989). Chez le ver à soie du mûrier (*Bombyx mori*), des études ont été réalisées pour exploiter les papillons mâles plus d'une fois afin de surmonter le problème de sex-ratio et de l'émergence désynchronisée des papillons (Benchamin et coll. ; 1990). Chez le ver à soie tasar (*Antheraea mylitta*), dans la pratique on a adopté la technique de l'accouplement répété (Ojha et coll., 1996). Dans cette étude, nous avons essayé de surmonter les contraintes du ver à soie muga, en manipulant son comportement d'accouplement pour standardiser

\* (Article présenté au 90<sup>ème</sup> Congrès Indien des Sciences, Bangalore, 3-7 janvier 2003).

les heures d'accouplement et l'utilisation du papillon mâle plus d'une fois afin d'améliorer la fourniture de graines de qualité aux fermiers.

## MATERIELS ET METHODES

On recueille les cocons de grainage auprès du Centre de Vulgarisation (Cooch Behar, West Bengal), de la *Regional Muga Research Station*, du *Central Silk Board* et on réalise l'expérience trois fois en 2001 – 2002 dans le Laboratoire de recherche du muga, de l'A.B.N. Seal College, à Cooch Behar Eleven. On sélectionne onze (11) traitements pour la standardisation des durées d'accouplement de 2 heures à 12 heures avec un intervalle d'une heure, la ponte et la rétention d'œufs étant pris comme les paramètres quantitatifs de production et le nombre et le pourcentage d'éclosion étant pris pour évaluer la production sur le plan qualitatif. De plus, dans une autre expérience, on exploite les mâles jusqu'à six fois en sept-oct et jusqu'à quatre fois en mars – avril avec une nouvelle femelle et on mesure la ponte, la rétention d'œufs et l'éclosion comme paramètres clés. On analyse toutes les données recueillies de manière statistique.

## RESULTATS

### a. Effet des différentes durées d'accouplement sur la ponte et l'éclosion des œufs :

On n'observe pas de différence significative entre les différentes durées d'accouplement sur la ponte, la rétention et l'éclosion d'œufs. Cependant, on observe la fécondité la plus élevée quand on laisse l'accouplement se produire pendant sept heures (287), le plus faible étant celui qu'on obtient pendant une durée de 12 heures (250). La rétention d'œufs est presque nulle en onze heures. L'éclosion d'œufs est la plus élevée après sept heures (284) soit 99,19 % et la plus faible a lieu en 12 heures avec respectivement une ponte de 235 et une éclosion de 94 % (Tableau I).

### b. Effet du nombre d'accouplements en utilisant un papillon mâle unique sur la ponte et l'éclosion d'œufs :

Les résultats obtenus avec un accouplement répété en mars – avril sont présentés dans le Tableau II et en septembre – octobre dans le Tableau III.

En mars – avril :

En mars – avril, avant la période d'élevage pour la deuxième récolte commerciale d'avril – mai, on peut forcer un papillon mâle à s'accoupler avec une nouvelle femelle jusqu'à quatre fois.

Ponte des œufs :

On observe des variations significatives entre les traitements. On enregistre la ponte des œufs la plus élevée quand on accouple un nouveau mâle et des papillons femelles (232). On observe une tendance à la baisse de la deuxième à la 4<sup>ème</sup> utilisation du même papillon mâle. On observe une variation significative de la ponte des œufs entre la deuxième (207) et la troisième exploitation (194) du même papillon mâle. Mais, on observe une baisse significative soudaine avec une utilisation extrême du papillon mâle pour la quatrième fois (75).

Rétention d'œufs :

La rétention d'œufs n'est pas significativement plus élevée à l'intérieur du corps de la femelle jusqu'à la troisième utilisation d'un mâle unique (7 à 15). Mais la rétention d'œufs dans le corps de la femelle quand on l'accouple avec un mâle utilisé pour la 4<sup>ème</sup> fois est très élevée (140), ce qui est presque le double des œufs pondus par cette femelle.

**Eclosion :**

Le nombre d'œufs ayant éclos est significativement plus élevé (231) chez les œufs de la femelle accouplée avec un nouveau mâle. On observe que le nombre d'œufs qui éclôt est de 197 et de 164 pour les œufs pondus par les femelles accouplées avec des mâles ayant été utilisés de manière répétée respectivement deux et trois fois. Le plus frappant est qu'aucun œuf n'éclopait quand la femelle est accouplée avec un mâle utilisé pour la quatrième fois.

**En septembre – octobre :**

En septembre – octobre, avant le principal élevage commercial, d'octobre – novembre, on peut exploiter un papillon mâle jusqu'à six fois pour l'accoupler avec des nouvelles femelles.

**Ponte des œufs :**

Comme en mars – avril, en septembre-octobre aussi, la ponte des œufs s'avère significativement plus élevée (264) quand on accouple une nouvelle femelle avec un nouveau mâle. Les œufs pondus par les femelles accouplées avec des mâles utilisés pour la 2<sup>ème</sup>, la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> fois présentent une variation non-significative (248-254). Le nombre d'œufs pondus par les femelles accouplées avec un mâle exploité pour la 5<sup>ème</sup> fois est significativement plus bas (237). L'utilisation répétée du papillon mâle pour la 6<sup>ème</sup> fois avec une nouvelle femelle donne une ponte très faible (136).

**Rétention d'œufs :**

La rétention d'œufs est de 6 à 16 à l'intérieur du corps de la femelle accouplée avec un papillon mâle unique utilisé jusqu'à quatre fois. On enregistre une quantité très importante de rétention d'œufs (125) à l'intérieur du corps de la femelle quand on l'accouple avec un mâle utilisé pour la cinquième fois.

**Eclosion d'œufs :**

On observe un nombre beaucoup plus élevé d'œufs qui éclosent chez la femelle accouplée avec un nouveau mâle (262) suivi de manière significative par les œufs pondus par une femelle accouplée avec des mâles utilisés pour la 2<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> fois (244 à 249). Le nombre d'œufs qui éclôt baisse considérablement chez les œufs pondus par des femelles accouplées avec un mâle utilisé de manière répétée pour la 5<sup>ème</sup> fois (199). De manière surprenante, aucun œuf n'éclopait chez les femelles accouplées avec un mâle utilisé pour la sixième fois.

## DISCUSSION

Le succès de l'élevage du muga dépend des graines (œufs). Le manque d'apport en œufs de qualité (éclosion élevée) a non seulement un effet sur l'élevage commercial mais déçoit aussi les fermiers qui essaient d'adopter l'élevage du muga dans la nouvelle zone de vulgarisation de l'élevage du muga, la zone terai du Bengale ouest. Les deux principales saisons d'élevage pour les récoltes commerciales sont octobre – novembre et avril – mai. La réussite du grainage en mars – avril et en septembre – octobre sont les étapes les plus importantes pour assurer l'apport d'une quantité importante de graines de qualité pour l'élevage commercial. L'émergence désynchronisée des papillons et la production d'un nombre inférieur de cocons de grainage sont les principales contraintes concernant la production d'œufs. L'accouplement répété en exploitant le même mâle peut aider à surmonter ce problème. Pour cela, il faut enregistrer les durées optimum pour l'accouplement. Nous avons donc enregistré dans la première expérience l'effet des différentes durées d'accouplement sur la ponte et sur l'éclosion des œufs (Tableau I). Les résultats non-significatifs obtenus avec les heures d'accouplement montrent que jusqu'à 12 heures d'accouplement, n'importe quelle durée à partir de la 2<sup>ème</sup> heure est suffisante pour obtenir une fécondation et une ponte d'œufs réussies, ce qui confirme les observations de Samson et Barah (1989) selon lesquels un accouplement de 3 à 5 heures est suffisant. D'après cette observation,

on peut exploiter la durée minimum d'accouplement et le mâle désaccouplé peut être utilisé pour un accouplement répété. Cependant, dans la pratique le mâle et la femelle fécondée peuvent être abîmés à la suite de blessures survenues pendant le désaccouplement en l'espace de cinq heures. Une durée d'accouplement de 7 heures entraîne la fécondation et l'éclosion les plus élevées, bien que les différences avec les autres ne soient pas significatives. On peut donc suggérer qu'une durée d'accouplement de 7 heures est optimum pour obtenir un accouplement, une ponte et une éclosion réussis.

Dans l'expérience suivante, on a réalisé un accouplement répété en exploitant les mâles pendant un maximum de quatre fois en mars- avril (Tableau II) et de six fois en septembre – octobre (Tableau III) parce qu'on a rapporté que la fertilité de la femelle chez le ver à soie dépend de leurs partenaires mâles (Sidhu et coll., 1967). Pendant les deux saisons, bien que le potentiel de fécondité de la femelle soit presque le même, l'accouplement répété change la ponte et l'éclosion. Avec un accouplement répété, l'exploitation des mâles jusqu'à 4 fois en mars – avril montre que l'utilisation d'un mâle jusqu'à 3 fois n'a pas d'effet nuisible sur la fécondité ainsi que sur l'éclosion. En septembre – octobre aussi, on n'observe pas de variation importante de la ponte des œufs chez les femelles accouplées avec des mâles utilisés pour la 2<sup>ème</sup>, la 3<sup>ème</sup> et la 4<sup>ème</sup> fois ; au-delà elle baisse considérablement et l'éclosion baisse aussi du premier accouplement jusqu'au 5<sup>ème</sup> accouplement. C'est ainsi qu'aucun œuf n'écloît à partir de la 6<sup>ème</sup> utilisation. L'utilisation d'un mâle jusqu'à quatre fois pendant cette saison est donc efficace en termes de ponte et d'éclosion des œufs.

Ces deux résultats confirment clairement ceux de Benchamin et coll., (1990), selon lesquels chez *Bombyx mori*, la fécondité est comparable dans les 4 premiers accouplements, mais diminue à partir du 5<sup>ème</sup> et du 6<sup>ème</sup> accouplement et ceux d'Ohja et coll., (1996) qui ont essayé un accouplement répété chez *Antheraea mylitta* où il s'avère que les femelles pondent des œufs même quand elles sont accouplées avec 4 mâles. Un accouplement répété entraîne une décharge inadaptée de fluide spermatique et entraîne une diminution de la fécondité (Sidhu et coll., 1967). Cela se traduit dans cette étude en termes de diminution de la ponte et du pourcentage de la fertilité. Les études précédentes indiquent aussi que la viabilité des œufs n'est pas considérablement affectée jusqu'à quatre accouplements chez les papillons mâles (Subramanyam, 1982).

Dans l'élevage du muga, comme la synchronisation du mâle et de la femelle est l'une des principales contraintes pour la production des œufs, on peut surmonter le problème en exploitant le papillon mâle de manière répétée jusqu'à quatre fois avant la principale saison d'élevage pour la récolte commerciale et jusqu'à trois fois avant le deuxième élevage commercial par accouplement artificiel pendant sept heures, ce qui permet au bout du compte un apport plus important d'œufs de qualité pour les fermiers.

## **STUDY ON SOME ECONOMIC CHARACTERS OF DIFFERENT COLOUR POLYMORPHS OF MUGA SILKWORM *ANTHRAEA ASSAMENSIS* HELFER**

**A. BHATTACHARYA, A. K. SAHU, B. C. PRASAD & R. CHAKRABORTY\***

Regional Muga Research Station, Boko, Assam 781 123, India.

*Muga silkworm Anthraea assamensis* Helfer shows various larval colour polymorphs, i. e., green, blue, yellow and orange of which occurrence of green colour polymorph is predominant. A study on their economic characters reveals that the yellow colour polymorph has the highest ERR ( $31.86\% \pm 0.12$ ), pupal weight ( $5.78 \text{ gm} \pm 0.03$ ) and realized average fecundity ( $145 \pm 0.95$ ) but has the lowest shell weight ( $0.40 \text{ g} \pm 0.01$ ). The blue colour polymorph though has the lowest ERR ( $12.50 \text{ g} \pm 0.09$ ) and pupal weight ( $5.51 \text{ g} \pm 0.01$ ), has the highest shell weight ( $0.47 \text{ g} \pm 0.01$ ). In the present study, emphasis has been laid on the utilization of the high shell weight of the blue polymorph, which is 17.50% more than yellow polymorphism and 9.30% more than green polymorph and on the high pupal weight of yellow polymorph, which is 4.90% of blue polymorph and 4.14% of green polymorph as a genetic resource in muga silkworm for their exploitation during commercial and seed crops, respectively, through conventional breeding and biotechnological techniques. This will enable the increase of raw silk productivity by utilizing lesser cocoons for getting 1 kg of silk and to ensure healthy disease free layings (dfls) for utilization during commercial crops.

**Keywords:** Muga silkworm, colour polymorphs (green, blue and yellow), economic characters, ERR, shell weight, pupal weight.

### **INTRODUCTION**

The advent of muga culture into Assam dates back to 1228 AD when the TaiAhoms brought the culture along with them from Northern Burma (Phukan 1998). Since then, this culture has become indigenous to the North Eastern region of India, particularly to Assam, where it is an integral part of its socio-cultural set up. Muga silkworm exists in varied larval polymorphic forms, i.e. green, blue, yellow, orange, and green larvae having a yellow lateral line. Besides, black muga moth has also been identified among predominant chestnut coloured moths (Thangavelu *et al.*, 1985-86 and 1984). They also exist in varied physiogenetic forms, i.e., wild non-diapausing and diapausing (though facultative) forms. Muga varieties of Haflong green and yellow mutant hibernating forms have also been identified (Sengupta *et al.*, 1974-75). Rao *et al.*, 1977-78, have isolated different strains of muga in various ontogenic stages, i.e.: eggs: tanned, non-tanned yellowing green and creamy showing better rearing performance; moth: having wings of ground colour, chestnut colour and chocolate colour of which chestnut and chocolate colour showed better rearing performance; larva: based on thoracic markings M3BP, M3BP and M3P were reisolated from Kamarbandha (Jorhat district of Assam, India), green stock; cocoon weight: as a meristic character showed that cocoons having high shell weight performed better.

\* Central Muga Eri Research & Training Institute, Lahdoigarh, Jorhat, Assam.

## MATERIAL AND METHOD

The blue and yellow muga silkworm larvae were collected from the predominant green population and reared simultaneously during commercial seasons at RMRS, Boko, Assam. The number of larvae considered per treatment per season was 2500. This study was conducted during six different seasons in a year, i. e., pre seed (PS), Jarua (Dec-Feb.), seed crop (SC), Chotua (Mar-Apr), commercial crop (CC), Jethua (May-June) PS Aherua (Jul-Aug), SC Bhodia (Aug-Sep) and CC Kotia (Oct–Nov) and thereafter, different economic characters, i. e. ERR, cocoon weight, shell weight, shell ratio, pupal weight and realized average fecundity were studied and compared with each other for identifying the promising characters for use in future breeding programs.

## RESULTS AND DISCUSSION

Rearing results (Table I) below show that ERR is maximum in the yellow polymorph ( $31.86\% \pm 0.12$ ) and minimum in blue polymorph ( $12.50\% \pm 0.09$ ) but shell weight is maximum in the blue polymorph ( $0.47 \text{ g} \pm 0.01$ ) and minimum in yellow polymorph ( $0.40 \text{ g} \pm 0.01$ ), which shows that raw silk production in kg assuming 45% silk recovery would be least in the blue polymorph (4728 cocoons / 1 kg raw silk  $\pm 26.75$ ) as against 5 556 cocoons / 1 kg of raw silk ( $\pm 25.06$ ) in yellow polymorph and 5168 cocoons / 1 kg of raw silk ( $\pm 12.33$ ) in green polymorph.

**Table I. Character evaluation of colour polymorphs of *Antheraea assamensis* Helfer.**

*Tableau I. Evaluation des caractères chez les polymorphes colorés d'*Antheraea assamensis* Helfer.*

| Type                 | ERR (%)                 | CW (g)                 | SW (g)                 | PW (g)                 | SR (%)                 | RAF                   | CRS (No.)               |
|----------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Green / Vert         | 22.74<br>( $\pm 0.22$ ) | 5.98<br>( $\pm 0.08$ ) | 0.43<br>( $\pm 0.03$ ) | 5.55<br>( $\pm 0.02$ ) | 7.19<br>( $\pm 0.02$ ) | 132<br>( $\pm 1.14$ ) | 5168<br>( $\pm 27.63$ ) |
| Blue / Bleu          | 12.50<br>( $\pm 0.09$ ) | 5.98<br>( $\pm 0.05$ ) | 0.47<br>( $\pm 0.01$ ) | 5.51<br>( $\pm 0.01$ ) | 7.86<br>( $\pm 0.01$ ) | 137<br>( $\pm 1.14$ ) | 4728<br>( $\pm 59.93$ ) |
| Yellow / Jaune       | 31.86<br>( $\pm 0.12$ ) | 6.18<br>( $\pm 0.03$ ) | 0.40<br>( $\pm 0.01$ ) | 5.78<br>( $\pm 0.03$ ) | 6.47<br>( $\pm 0.04$ ) | 145<br>( $\pm 0.95$ ) | 5556<br>( $\pm 25.09$ ) |
| CD at 5%<br>DC à 5 % | 0.58                    | N/S                    | N/S                    | 3.99                   | 5.44                   | 5.16                  | 1.17                    |

Figures in brackets are standard errors over mean / Les chiffres entre parenthèses sont l'intervalle de confiance de la moyenne.

**Note :** ERR : Effective rate of rearing / Taux effectif d'élevage. CW : Cocoon weight / Poids du cocon. SW : Shell weight / Poids de la coque. PW : Pupal weight / Poids de la nymphe. SR : Shell ratio / Richesse soyeuse. RAF : Realized absolute fecundity / Fécondité absolue obtenue. CRS : Estimated no. of cocoons required for producing 1 kg of raw silk / Estimation du nombre de cocons nécessaires pour produire 1 kg de soie grège.

This shows that shell weight of blue polymorph is 15.50% more than yellow polymorph and 9.30% more than green polymorph. The raw silk recoveries based on shell weight only is more in yellow polymorph over blue polymorph by 17.51% and 8.51% more over green polymorph. The yellow polymorph though has minimum shell weight amongst the other polymorphs but has maximum pupal weight ( $5.78 \text{ g} \pm 0.03$ ) and fecundity ( $145 \pm 0.95$ ). Earlier study in saturniids reveals that there is a direct correlation between pupal weight and fecundity (Singh and Prasad, 1987, Barah and Sengupta, 1991). Hence, from the present study it could be emphasised that the high shell weight of the blue polymorph and the high pupal weight of yellow polymorph could be considered as an important genetic resource and could be utilized for evolving improved varieties of muga silkworm through conventional breeding and biotechnological techniques for utilizing them during commercial crops for raw silk production and seed crops with more fecundity, hatching percentage and survivability, respectively.

## REFERENCES

- BARAH A. & SENGUPTA A. K. (1991) Correlation and regression studies between pupal weight and fecundity of muga silkworm *A. assama* (Lepidoptera: Saturniidae) on four different food plants. Acta Physiol. Hungarica, 78(3), pp.261-264.
- PHUKAN, R. 1998, Golden yellow culture of Assam. Indian Silk, June, pp.14.
- RAO G. S., DAS P. K. & KAKOTI P. K. 1977-78. Isolation and purification of useful strains of muga and study of their combining ability. Isolation and purification of useful strains. Ann. Rep. CM&ERS, Titabor, Assam, pp. 26-29.
- SENGUPTA K., SINGH K. & DAS S. K., 1974-75: Collection and maintenance of different muga races (*Antheraea assama*). Ann. Rep. CM&ERS, Titabor, Assa, pp. 37-39.
- SINGH R. & PRASAD B. 1987: Correlation among body weight, pupal weight and fecundity in eri silkworm *Philosamia ricini* Hutt. (Lep.: Saturniidae), Sericologia, 27(1) pp. 49-50.
- THANGAVELU K., BARAH A. & CHAKRABORTY A. K. (1984) Colour polymorphism in muga silkworm *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae). Curr. Sci. June 5, vol. 5, No. 11, pp.594-595.
- THANGAVELU K., BARAH A. & CHAKRABORTY A. K. 1985-86: Survey and collection of natural variants of muga silkworms. Ann. Rep. RMRS, Mirza, Assam, pp. 26-27.

## ETUDE DE CERTAINS CARACTERES ECONOMIQUES DE DIFFERENTS POLYMORPHES DE COULEUR DU VER A SOIE MUGA *ANTHRAEA ASSAMENSIS* HELFER

A. BHATTACHARYA, A. K. SAHU, B. C. PRASAD & R. CHAKRABORTY\*

Regional Muga Research Station, Boko, Assam 781 123, Inde.

*Le ver à soie muga Anthraea assamensis Helfer présente plusieurs polymorphes de couleur larvaire, c'est à dire vert, bleu, jaune et orange le polymorphe vert étant le plus courant. Une étude sur leurs caractères économiques révèle que le polymorphe de couleur jaune a l'ERR (31,86 %  $\pm$  0,12), le poids nymphal (5,78 g  $\pm$  0,03) et la fécondité moyenne (145  $\pm$  0,95) les plus élevés mais a le poids de coque le plus faible (0,40 g  $\pm$  0,01). Le polymorphe de couleur bleue a l'ERR (12,50 g  $\pm$  0,09) et le poids nymphal (5,51 g  $\pm$  0,01) les plus faibles et le poids de coque le plus élevé (0,47 g  $\pm$  0,01). Dans cette étude, nous avons mis l'accent sur l'utilisation du poids de coque élevé du polymorphe bleu, qui est 17,50 % plus élevé que celui du polymorphe jaune et 9,30 % plus élevé que celui du polymorphe vert et sur le poids nymphal élevé du polymorphe jaune, qui est 4,90 % supérieur à celui du polymorphe bleu et 4,14 % plus élevé que celui du polymorphe vert comme ressources génétiques chez le ver à soie muga pour les exploiter pendant les récoltes commerciales et de grainage respectivement par lignage conventionnel et grâce à des techniques de biotechnologie. Cela permettra l'augmentation de la productivité de la soie grège en utilisant moins de cocons pour obtenir 1 kg de soie et pour s'assurer d'obtenir des pontes saines (df/s) à utiliser pour les élevages commerciaux.*

### INTRODUCTION

L'arrivée de l'élevage du muga dans l'Assam remonte à 1228 avant J. C. quand les TaiAhoms ont amené la culture avec eux du nord est du Burma (Phukan, 1998). Depuis, cette culture est devenue indigène dans la région du nord-est de l'Inde, particulièrement dans l'Assam, où elle fait partie intégrante de l'environnement culturel. Le ver à soie muga existe sous des formes polymorphiques larvaires variées, c'est à dire des larves vertes, bleues, jaunes, oranges et vertes avec une ligne latérale jaune. De plus, on a aussi identifié des papillons muga noirs parmi les papillons de couleur châtaigne qui dominant (Thangavelu et coll., 1985-86 et 1984). Ils existent sous des formes physiogénétiques variées, c'est à dire des formes sauvages sans diapause et à diapause (bien que facultative). On a aussi identifié des formes à hibernation des variétés muga Haflong vert et du mutant jaune (Sengupta et coll., 1974-75). Rao et coll., 1977-78 ont isolé différentes souches du muga à des stades ontogéniques variés : œufs : brunis, vert jaune non brunis et crémeux présentant une meilleure performance d'élevage ; papillon : ailes de la couleur du sol, de couleur marron et chocolat dont ceux de couleur marron et chocolat présentent la meilleure performance d'élevage ; larves : d'après les marques sur le thorax M3BP, M3PB et M3P ont été réisolées de Kamarbandha (zone de Jorhat dans l'Assam en Inde), souche verte ; poids du cocon : en tant que caractère méristique, il montre que les cocons avec un poids de coque élevé sont plus performants.

\* Central Muga Eri Research & Training Institute, Lahdoigarh, Jorhat, Assam.

## MATERIEL ET METHODE

On recueille les larves du ver à soie muga bleues et jaunes dans la population verte dominante et on les élève simultanément pendant les saisons commerciales au RMRS, à Boko, dans l'Assam. Le nombre de larves considéré par traitement par saison est de 2500. On a réalisé cette étude pendant six saisons différentes sur une année, c'est à dire Jarua avant le grainage (PS) (Dec-Fev.), Chotua récolte de grainage (SC) (Mars-Avril), Jethua récolte commerciale (CC) (mai-juin), PS Aherua (juillet – août), SC Bhodia (août – sept.) et CC Kotia (oct – nov.). Puis, on étudie les différents caractères économiques, c'est à dire le taux effectif d'élevage (ERR), le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse, le poids nymphal et la fécondité moyenne et on les compare les uns aux autres pour identifier les caractères prometteurs afin de les utiliser dans les futurs programmes de lignage.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats d'élevage (Tableau I) ci-dessous montrent que l'ERR est maximum chez le polymorphe jaune ( $31,86 \% \pm 0,12$ ) et minimum chez le polymorphe bleu ( $12,50 \% \pm 0,09$ ) mais le poids de la coque est maximum chez le polymorphe bleu ( $0,47 \text{ g} \pm 0,01$ ) et minimum chez le polymorphe jaune ( $0,40 \text{ g} \pm 0,01$ ), ce qui montre que la production de soie grège en kg en supposant une récupération de soie de 45 % serait inférieure chez le polymorphe bleu (4728 cocons / 1 kg de soie grège  $\pm 26,75$ ) contre 5 556 cocons / 1 kg de soie grège ( $\pm 25,06$ ) chez le polymorphe jaune et 5168 cocons / 1 kg de soie grège ( $\pm 12,33$ ) chez le polymorphe vert.

Cela montre que le poids de la coque du polymorphe bleu est 15,50 % plus élevé que celui du polymorphe jaune et 9,30 % plus élevé que celui du polymorphe vert. La récupération de soie grège en fonction seulement du poids de la coque est plus élevée chez le polymorphe jaune que chez le polymorphe bleu de 17,51 % et de 8,51 % par rapport au polymorphe vert. Cependant, le polymorphe jaune a le poids de coque minimum par rapport aux autres polymorphes mais il a le poids nymphal ( $5,78 \text{ g} \pm 0,03$ ) et la fécondité ( $145 \pm 0,95$ ) maximum. Une étude précédente chez les saturnidés révèle qu'il existe une corrélation directe entre le poids nymphal et la fécondité (Singh et Prasad, 1987, Barah et Sengupta, 1991). Ainsi d'après cette étude, on pourrait souligner que le poids de coque élevé du polymorphe bleu et le poids nymphal élevé du polymorphe jaune pourraient être considérés comme une ressource génétique importante et pourraient être utilisés pour mettre au point des variétés améliorées du ver à soie muga par des techniques de lignage conventionnel et de biotechnologie pour les utiliser pour les récoltes commerciales et la production de soie grège et pour les récoltes de grainage avec respectivement une fécondité, un pourcentage d'éclosion et une survie plus élevés.

## REACTION OF DIFFERENT CULTIVARS OF *PERSEA BOMBYCINA* KOST TOWARDS LEAF SPOT DISEASE CAUSED BY *PHYLLOSTICTA PERSEAE* ELL. & MART

RANJANA DAS, K. DAS & R. CHAKRAVORTY

Central Muga Eri Research & Training Institute, Lahdoigarh -785700, Jorhat, Assam, Inde.

*The leaf spot disease of Persea bombycina Kost. caused by Phyllosticta perseae Ell. & Mart was recorded in the conventional muga growing areas of Assam. Different cultivars of som were artificially screened under field condition against the leaf spot disease to locate resistant donors. Among the six cultivars tested for their reaction to the disease by artificial inoculation in pot culture, S-3 had a resistant reaction to leaf spot disease (2.2 PDI) and S-6 exhibited moderately resistant reaction recording 5.3 PDI. The other cultivars were moderately susceptible or highly susceptible (21.—51.4 PDI) to the leaf spot diseases.*

**Keywords:** Disease, incidence, resistant, som, susceptible.

### INTRODUCTION

*Persea bombycina* Kost is the primary food plant of muga silkworm *Antheraea assama* Westwood, a commercial silk producer in North east India. The food plant is infected by leaf spot disease caused by *Phyllosticta perseae* Ell. & Mart. This disease causes severe crop losses and also reduces leaf quality (Das and Benchamin, 2000 ). Resistant variety is the only feasible and economical way for the management of the disease. Although different cultivars of *Persea bombycina* were described by different workers (Chaudhuri, 1981 ; Raja Ram *et al.*, 1993 and Hazarika and Katakya, 1996) , it was seen that no work was done on screening of different cultivars towards different foliar diseases. It is in this context, investigations were undertaken to search cultivars with resistance to leaf spot disease, so that they can be used in breeding programs for developing resistant genotypes.

### MATERIALS AND METHODS

Six cultivars of *Persea bombycina* i. e., S-3, S-4, S-6, S-7, and S-8 were screened for resistance to *Phyllosticta perseae* Ell. & Mart.

#### Field evaluation:

Twenty five seedlings of three month old cultivars were planted at a distance of 3m × 3m during 2000-2002 at the experimental farm of Central Muga Eri Research and Training Institute a hot spot for diseases. All the cultivars were inoculated three times with the spores of *Phyllosticta perseae* by spray inoculation method (Kruger and Hoffmann 1978) with the help of an atomizer. The data on disease severity were recorded by using 0-5 scale and different cultivars were categorized into highly resistant, resistant, moderately resistant, moderately susceptible and susceptible on the basis of 0-5, 6-10, 11-20, 21-30 and more than 30 per cent severity index, respectively.

**Laboratory evaluation:**

Three months old seedlings were raised in mud pots (35 × 25cm) in uniform sterilized soil mixture (4 kg/pot) 3 months old seedlings were inoculated with the virulent isolate of the pathogen by spray inoculation method. The spore concentration was adjusted with the help of an hemocytometer. Nine seedlings of each cultivars were tested for the experiments. The inoculated plants were kept for four days in the growth chamber having a  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  with more than 90% relative humidity and 12 h photoperiod. Thereafter these plants were transferred to a green house.

Disease reaction was recorded twelve days after inoculation by following the method described in Anonymous (1984). Data were recorded at a regular intervals of fifteen days. In each plant the total number of diseased and healthy leaves were recorded in five selected branches to calculate the Percent Disease Index (PDI) using the grading scale (Anonymous, 1984). Resistant reaction of different cultivars was assessed based on the basis of (severity) percent of disease index as highly resistant, resistant, moderately resistant, moderately susceptible and susceptible on the basis of 0 - 5, 6 - 10, 11 - 20, 21-30 and more than 30 per cent severity index, respectively (0-5 scale, Baker, 1961).

The reaction of all cultivars was evaluated thrice. The disease reaction of resistant cultivar was further confirmed by detached hypocotyl method (Chakrabarty and Bambawale 1991) and spray inoculation method with different cultivars

**RESULTS AND DISCUSSION**

The degree of disease incidence in different cultivars is presented in Table I. Among the six cultivars tested for their reaction to the leaf spot disease by artificial inoculation in pot culture, cultivar S-3 was highly resistant to leaf spot disease recording the minimum disease grade with less than 5% incidence (2.2 PDI) and cultivar S-6 was moderately resistant.

**Table I. Reaction of different cultivars of *P. bombycina* to *Phyllosticta perseae* by artificial inoculation in the field net.**

**Tableau I. Reaction de différents cultivars de *P. bombycina* à *Phyllosticta perseae* par inoculation artificielle sur le terrain.**

| Sl. No.             | Cultivars | Leaf spot (Grade)                   |
|---------------------|-----------|-------------------------------------|
| <i>No. de série</i> |           | <i>Tache de la feuille (niveau)</i> |
| 01                  | S-3       | 2.2 <sup>HR</sup>                   |
| 02                  | S-4       | 31.4 <sup>S</sup>                   |
| 03                  | S-5       | 21.1 <sup>S</sup>                   |
| 04                  | S-6       | 15.3 <sup>MR</sup>                  |
| 05                  | S-7       | 32.6 <sup>S</sup>                   |
| 06                  | S-8       | 22.4 <sup>MS</sup>                  |

Cultivar S-8 was recorded as moderately susceptible while cultivars S-4, S-5 and S-7 showed susceptible to leaf spot disease. The perusal of literature indicated that only limited work was done in this aspect. The study provides scope for identification of resistant sources against this disease and using the same for developing resistant varieties for the effective management of the disease.

## REFERENCES

- ANONYMOUS (1984) Guideline for the biological evaluation of fungicides No 68 O.E.P.P./E.P.P.O. Bulletin 14 : 227.
- BAKER J.V., (1961) A method of assessing of apple powdery mildew. Plant Pathol., 10(1); 32-37.
- CHOUDHURI S.N.(1981) Muga Silk Industry. Directorate of Sericulture, Assam.pp.34-35.
- CHAKRAVORTY P.K. & BAMBAWALAO.M.(1991) Detached hypocotyl method – An efficient technique for screening of beans for anthracnose. Indian Phytopath.44: 246-247
- DAS. R. & BENCHAMIN K.V. (2000) Diseases of muga and eri food plants, Incidence pattern, Intensity and control measures. Proceedings of Seminer on Sericulture R & D in muga & eri. Pp.34-45.
- HAZARIKA L.K. & Katakya, A.(1996) Morphotypes of *Machillus bombycina* King based on feeding preference of Muga silkworm Shashpa, 3(2) :121-126.
- KRUGER JAND HOFFIMANN G.M.(1978).Influence of temperature on cultivar-race reaction in *Phaseolus vulgaris* against *Colletotrichum lindemuthianum*. Gartenb auwiss.43:109.
- RAJA RAM, SENGUPTA A., DAS R. DEVNATH M. & SAMSON M. V.(1993) Collection Identification and Evaluation of *Machillus bombycina* King Germplasm, the Muga Food Plant. Sericologia 33(1)109-124.

## REACTION DE DIFFERENTS CULTIVARS DE *PERSEA BOMBYCINA* KOST A LA MALADIE DE LA TACHE DE LA FEUILLE PROVOQUEE PAR *PHYLLOSTICTA PERSEAE* ELL. & MART

RANJANA DAS, K. DAS & R. CHAKRAVORTY

Central Muga Eri Research & Training Institute, Lahdoigarh – 785700, Jorhat, Assam.

*La maladie de la tache de la feuille chez Persea bombycina Kost. provoquée par Phyllosticta perseae Ell. & Mart a été identifiée dans les zones traditionnelles d'élevage du muga dans l'Assam. Nous avons évalué artificiellement sur le terrain la réaction de différents cultivars de Som à la maladie de la tache de la feuille pour localiser les donneurs résistants. Parmi les six cultivars testés pour leur réaction à la maladie inoculée artificiellement dans des cultures en pots, S-3 présente une résistance à la maladie de la tache de la feuille (PDI 2,2) et S-6 présente une réaction modérément résistante en enregistrant un P.D.I. de 5,3. Les autres cultivars sont modérément sensibles ou très sensibles (PDI 21 - 51,4) aux maladies de la tache de la feuille.*

### INTRODUCTION

*Persea bombycina* Kost est la plante hôte primaire du ver à soie muga *Antheraea assama* Westwood, un producteur de soie commerciale du nord-est de l'Inde. La plante hôte est infestée par la maladie de la tache de la feuille provoquée par *Phyllosticta perseae* Ell. & Mart. Cette maladie provoque des pertes de récoltes sévères et diminue aussi la qualité de la feuille (Das et Benchamin, 2000). La seule façon de lutter contre la maladie est d'utiliser une variété résistante. Bien que différents cultivars de *Persea bombycina* aient été décrits par différents chercheurs (Chaudhuri, 1981 ; Raja Ram et coll., 1993 et Hazarika et Katakya, 1996), on constate qu'aucune étude n'a été réalisée sur l'évaluation de différents cultivars par rapport à différentes maladies foliaires. C'est dans ce contexte, que nous avons entrepris des recherches pour trouver des cultivars résistants à la maladie de la tache de la feuille, pour les utiliser dans des programmes de lignage et mettre au point des génotypes résistants.

### MATERIELS ET METHODES

On a évalué la résistance de six cultivars de *Persea bombycina*, c'est à dire S-3, S-4, S-5, S-6, S-7 et S-8 à *Phyllosticta perseae* Ell. & Mart.

#### **Evaluation sur le terrain :**

On a planté vingt-cinq plantules de cultivars de trois mois à une distance de 3m × 3m en 2000-2002 à la ferme expérimentale du *Central Muga Eri Research and Training Institute*, un haut lieu pour les maladies. On inocule tous les cultivars trois fois avec les spores de *Phyllosticta perseae* par vaporisation (Kruger et Hoffmann, 1978) à l'aide d'un atomiseur. On enregistre les données sur la sévérité de la maladie en utilisant une échelle de 0 à 5 et on classe les différents cultivars dans les catégories très

résistant, résistant, modérément résistant, et modérément sensible sur la base d'un indice de sévérité de la maladie de respectivement 0 à 5, de 6 à 10, de 11 à 20, de 21 à 30 et de plus de 30 pour-cent.

**Evaluation en laboratoire :**

On cultive des plantules de trois mois dans des pots remplis de terre (35 × 25cm) dans un mélange de sol stérilisé uniforme (4 kg / pot), puis on inocule les plantules de 3 mois avec l'isolat virulent du pathogène par vaporisation. On ajuste la concentration en spores à l'aide d'un hémocytomètre. On teste neuf plantules de chaque cultivar pour les expériences. On conserve les plants inoculés pendant quatre jours dans la chambre de croissance à  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  avec plus de 90 % d'humidité relative et une photopériode de 12 h. Puis on transfère ces plants en serre.

On enregistre la réaction à la maladie douze jours après l'inoculation en suivant la méthode décrite par un anonyme (1984). On enregistre les données à des intervalles réguliers tous les quinze jours. Chez chaque plant, on enregistre le nombre total de feuilles malades et saines sur cinq branches sélectionnées pour calculer l'Indice de Pourcentage de la Maladie (PDI) en utilisant une échelle de classement (Anonyme, 1984). On évalue la résistance des différents cultivars en tant que très résistant, résistant, modérément résistant, modérément sensible et sensible sur la base d'un indice de la maladie de respectivement 0 à 5, 6 à 10, 11 à 20, 21 à 30 et de plus de 30 pourcent (échelle 0 à 5, Baker, 1961).

On évalue la réaction de tous les cultivars trois fois. On confirme la réaction à la maladie du cultivar résistant par la méthode de détachement de l'hypocotyle (Chakrabarty et Bambawale, 1991) et la méthode d'inoculation par vaporisation.

## RESULTATS ET DISCUSSION

Le degré d'incidence de la maladie chez les différents cultivars est présenté dans le Tableau I. Parmi les six cultivars cultivés en pot testés pour leur réaction à la maladie de la tache de la feuille par inoculation artificielle, le cultivar S-3 est très résistant à la maladie de la tache de la feuille et enregistre le niveau minimal de maladie avec une incidence de moins de 5 % (PDI de 2,2) et le cultivar S-6 est modérément résistant.

On constate que le cultivar S-8 est modérément résistant tandis que les cultivars S-4, S-5 et S-7 sont sensibles à la maladie de la tache de la feuille. L'étude de la littérature indique qu'il n'y a eu que des travaux limités réalisés à ce sujet. Cette étude a permis d'identifier des sources résistantes à la maladie qui pourront être utilisées pour la mise au point de variétés résistantes pour lutter efficacement contre la maladie.

## 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.

## 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 (4ème 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. Seric. 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 x 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.

