

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

Articles scientifiques / Scientific papers

- Comparison of different selection indices for genetic improvement of economic traits in silkworm (*Bombyx mori* L.) lines 137**
Comparaison de différents indices de sélection pour l'amélioration génétique des caractères économiques chez le ver à soie (*Bombyx mori* L.) 145
M. GHANIPOOR, S. Z. MIRHOSSEINI, A. SHADPARVAR, A. R. SEIDAVI & A. R. BIZHANNIA

- Biological control of root rot pathogens in mulberry by antagonistic bacteria 149**
Lutte biologique contre les pathogènes du pourrissement de la racine chez le mûrier avec des bactéries antagonistes 161
MOSTAPHA NIKNEJAD KAZEMPOUR, ESMAEIL KAMRAN & AFSANEH MERAT

Rapports techniques / Technical reports

- Investigation on necessity and methods of establishment of sericultural co-operatives . 169**
Etude sur le besoin et sur les méthodes de création de coopératives séricicoles 177
ALIREZA SEIDAVI, ALIREZA BIZHANNIA, MOEINNODIN MAVVAJPOUR, ZIAODDIN MIRHOSEINI & MANI GHANIPOOR

- Grainage parameters of commercial silkworm hybrids as influenced by various levels of nitrogen supplied through different organic sources 183**
Paramètres de grainage d'hybrides commerciaux du ver à soie sous l'influence de niveaux d'azote variés apportés par différentes sources organiques 199
A. RAVIKUMAR, T. K. NARAYANASWAMY, M. A. SHANKAR, B. SANNAPPA & D. CHANDRAPPA

- Induction of systemic resistance in mulberry against leaf rust (*Cerotelium fici*) disease by chemical plant activators 203**
Induction de la résistance systémique contre la maladie de la rouille de la feuille (*Cerotelium fici*) chez le mûrier grâce à des activateurs chimiques des plantes 213
V. P. GUPTA, KHASRU ALAM, VINEET KUMAR, G. S. VINDHYA & R. K. RAJAN

- A review of fungal diseases on mulberry trees (*Morus alba*) in Guilan province . . . 219**
Les maladies fongiques des mûriers (*Morus alba*) dans la province de Guilan 225
MOSTAFA NIKNEJAD KAZEMPOUR & ESMAEIL KAMRAN

Notes brèves / Brief notes

Parthenogenetic development in excised eggs of F1 hybrids of the silkworm, <i>Bombyx mori</i> L.	229
Développement parthénogénétique chez des œufs excisés d'hybrides F1 du ver à soie <i>Bombyx mori</i> L.	233
DEBNIRMALYA GANGOPADHYAY & RAVINDRA SINGH	
Impact of Helium-neon laser on bio-commercial traits of silkworm, <i>Bombyx mori</i> L.	235
Impact du laser Helium-neon sur les caractéristiques bio-commerciales du ver à soie, <i>Bombyx mori</i> L.	239
S. R. HOSAGOUDAR & H. B. MANJUNATHA	

COMPARISON OF DIFFERENT SELECTION INDICES FOR GENETIC IMPROVEMENT OF ECONOMIC TRAITS IN SILKWORM (*BOMBYX MORI* L.) LINES

M. GHANIPOOR¹, S. Z. MIRHOSSEINI², A. SHADPARVAR², A.R. SEIDAVI^{3*} & A. R. BIZHANNIA¹

1. Iran Silkworm Research Center, Rasht, Iran.

2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Iran.

3. Islamic Azad University, Science and Research Branch, Iran (Corresponding Author).

Genetic parameters and economic values of some important traits in six commercial silkworm pure lines (110, 107, 101433, Xinhong1, Koming1 and Y) were analyzed and selection indices for these traits were developed. Economic values of traits were estimated by data simulation method using a deterministic model. Individual recordings on cocoon weight, shell weight and shell ratio were carried out in six generations. Heritability and correlation coefficients were estimated by REML method. Heritability of cocoon weight and cocoon shell weight were higher than heritability of cocoon shell ratio. In each variety, three selection indexes including conventional index, restricted index and base index were constructed. Restricting the genetic gain of cocoon weight caused economic efficiency to reduce. The negative effect of restricting index in Koming1 line was lower due to lower genetic correlation between cocoon weight and shell weight and as a result, less effect on genetic gain of shell weight. Results obtained from this study showed that the separate breeding strategy must be designed in the varieties and different selection index should be constructed.

Keywords: Cocoon, genetic parameters, selection index, silkworm.

INTRODUCTION

The aim of silkworm breeding is to improve economic traits in order to increase the profit of cocoon producers and other sections of sericulture industry. In sericulture numerous traits are considered as important. The importance of these traits in various parts of this industry is different. Because the economic importance of different traits is not similar, hence the main emphasis should be focused on the traits which have more value in economic efficiency of production system. The use of selection index for genetic and economic improvement of traits in the shortest time will have the highest improvement (Harris, 1970).

A few studies had been occurred on determination of better selection indices based on important characteristics. The selection index method which incorporates genetic, phenotypic and economic parameters has been widely used for determining the selection emphasis in livestock breeding (Harris and Newman, 1992). Kumaresan *et al.* (2000) have performed the selection index program for quantitative traits of 56 multivoltine silkworm races which resulted into three clusters of ten genotypes

* Corresponding Author Address (Alireza Seidavi): House No. 180- Vali Asr Alley- Chamran Avenue- Rasht- Gilan- I.R.Iran. Posting code: 41857-43999 Email: alirezaseidavi@yahoo.com

with index values for utilization in hybridization. In another study (Kumar *et al.*, 1995) selection indices of 46 bivoltine races of silkworm were determined.

The goal of the present study is to determine selection indices for cocoon weight, shell weight and shell percentage in 6 silkworm pure lines and to compare efficiency of different selection indices in these varieties.

MATERIALS AND METHODS

The present investigation has been performed on 6 pure lines which were produced in Silkworm Research Center of Iran including *Xinhong1*, *107* and *101433* (with Japanese origin) and *110*, *Koming1* and *Y* (with Chinese origin). Silkworm rearing technique included single batch rearing system. Feeding and other conditions of larval rearing were conducted following the standard procedure (ESCAP, 1993). In order to estimate genetic and environmental parameters of cocoon weight, shell weight and shell percentage, the data obtained from 6 rearing periods or generations (3 spring rearing seasons and 3 autumn rearing seasons) as well as base population (80 male and 80 female cocoons in each line) were used. In each line and generation, 24 families were reared so that 30 male and 30 female full sib cocoons were individually recorded for cocoon traits per family. Totally, the size of data used for estimating genetic parameters was 8800 records per line for each trait. Variance and covariance components were estimated with the method of restricted maximum likelihood (REML) through derivative free algorithm based on full sib data in a 3 traits animal model and then genetic, environmental and phenotypic correlations and also heritability of traits were derived.

For calculating economic values, the data simulation method by system analysis was used. In this method, using a mathematical model, relation between returns, costs and in general, production system components are explained and this is known as profit equation. More details on deriving economic values have been presented in reference (Ghanipoor, 2002).

The calculated selection indices included conventional index, restricted index (for restricting cocoon weight improvement) and base index. Source of information in conventional index included individual information from the three traits. The conventional index coefficients were calculated from the following equation:

$$b = P^{-1}Gv \quad [2]$$

In the above equation P is $m \times m$ matrix of phenotypic covariance between record sources, G is $m \times n$ matrix of additive genetic covariances between record sources and animal additive genetic values for the present traits in aggregate genotype and v is $n \times 1$ vector of trait economic values (m and n are number of record sources in selection index and number of traits in breeding objective, respectively).

The selection index coefficients in restricted index (which was formed for limiting genetic gain of cocoon weight) were calculated from the following equation (Akbar *et al.*, 1986):

$$b = [I_d - P^{-1}GC_r(C_r'G'P^{-1}GC_r)^{-1}C_r'G']P^{-1}Gv \quad [3]$$

In the above equation I_d is $m \times m$ identity matrix and C_r is a $n \times 1$ zero vector which only in the row of cocoon weight (the trait which has been restricted) is equal to 1. Selection in base index (I_{bp}) was based on own individual corrected phenotype (corrected for fixed effects) and as a result, vector of index coefficients and economic values were equal. It means:

$$I_b = v \quad [4]$$

$$I_b = \frac{1}{v} x \quad [4]$$

The expected change in mean additive genetic values of traits (R_g) and also expected gain in economic efficiency of production system (R_H) were calculated from the following equations:

$$R_g = i \frac{b'G}{\sigma_I} \quad [5]$$

$$R_H = i r_{H,I} \sigma_H \quad [6]$$

where σ_I and σ_H are selection index and aggregate genotype standard deviations, $r_{H,I}$ is selection accuracy and i is selection intensity which was considered as unit.

RESULTS AND DISCUSSION

The economic values of traits are presented in Table I. Using genetic parameters (Figures 1 and 2) and economic values (Table I), selection indices were constructed. In Table II expected genetic changes of the traits after one generation of selection by the indices are presented. In conventional and base indices, the expected gain of shell weight was higher in 101433 and in restricted index, improvement of this trait was higher in *Koming1*. The highest expected genetic gain for shell percentage was related to line *Koming1*. The expected genetic improvement of cocoon weight in line 101433 was higher due to higher heritability and genetic correlation with shell weight. Accordingly, the higher improvement of shell weight in 101433 is due to its higher heritability and correlation with cocoon weight.

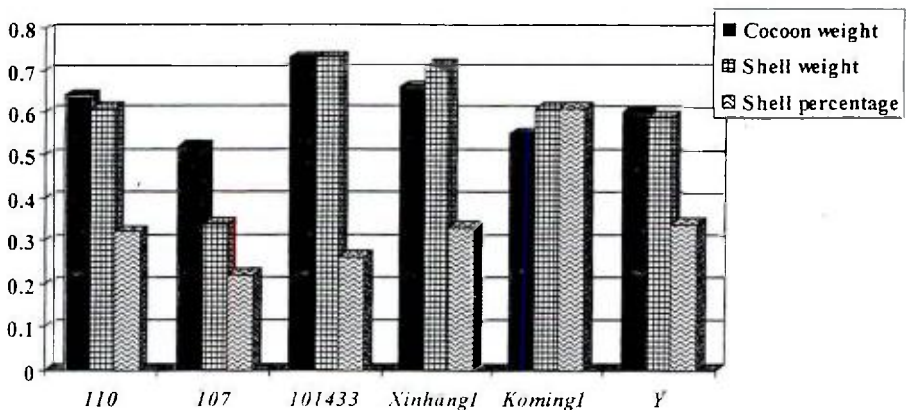


Figure 1. Heritability of cocoon weight, shell weight and shell percentage in the studied varieties.

Figure 1. Héritabilité pour le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse chez les variétés étudiées.

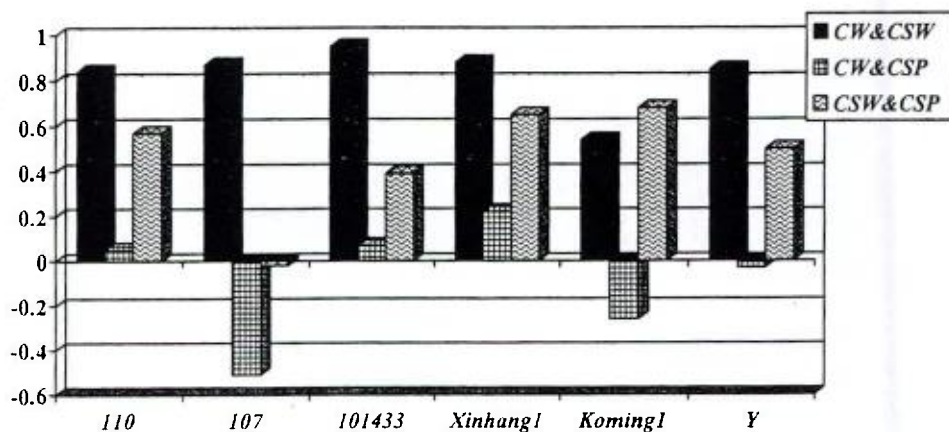


Figure 2. Additive genetic correlations among cocoon weight (CW), cocoon shell weight (CSW) and cocoon shell percentage (CSP) in the studied varieties.

Figure 2. Corrélations génétiques additives pour le poids du cocon (CW), le poids de la coque soyeuse (CSW) et le pourcentage de richesse soyeuse (CSP) chez les variétés étudiées.

Table I. Economic values of traits (per breeding moth per year) in the studied varieties.

Tableau I. Valeurs économiques pour les caractères (par papillon par année) chez les variétés étudiées.

Variety	Cocoon weight	Shell weight	Shell percentage
Variété	Poids du cocon (US \$/g)	Poids de la coque (US \$/g)	Richesse soyeuse (US \$/%)
110	0.782	13.870	0.227
107	0.780	21.774	0.316
101433	0.644	15.366	0.267
Xinhong1	0.739	45.305	0.706
Koming1	0.736	18.135	0.295
Y	0.836	11.036	0.175

Table II. Expected genetic change of mean traits for cocoon weight (g), shell weight (g) and shell percentage (%) in different selection indexes in the studied varieties.

Tableau II. Changements génétiques escomptés pour les principaux caractères, le poids du cocon (g), le poids de la coque (g) et la richesse soyeuse (%) avec différents indices de sélection chez les variétés étudiées.

Variety	Conventional index			Restricted index			Base index		
	Cocoon weight	Shell weight	Shell percentage	Cocoon weight	Shell weight	Shell percentage	Cocoon weight	Shell weight	Shell weight
	Indice conventionnel			Indice restreint			Indice de base		
	Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse	Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse	Poids du cocon	Poids de la coque	Richesse soyeuse
Variété									
110	0.065	0.019	0.35	0	0.0097	0.52	0.056	0.017	0.38
107	0.049	0.009	-0.06	0	0.0031	0.22	0.024	0.006	0.11
101433	0.132	0.034	0.26	0	0.0067	0.42	0.098	0.027	0.33
Xinhong1	0.085	0.030	0.59	0	0.0100	0.57	0.060	0.023	0.54
Koming1	0.018	0.019	1.01	0	0.0170	1.10	0.020	0.019	0.96
Y	0.065	0.020	0.35	0	0.0096	0.54	0.056	0.019	0.37

As a result, it is expected that restricting the genetic improvement of cocoon weight in line 101433 causes considerable reduction of shell weight gain. Since, the shell weight is the most important economic trait, hence reduced improvement in this trait will bring about great economic decline. The negative effect of restricting index on selection efficiency in *Koming1* was lower due to lower genetic correlation between cocoon weight and shell weight and as a result, less effect on genetic gain of shell weight. Lciri *et al.* (2004) have suggested that *BLUP* selection should always be preferred to restricted *BLUP* selection because of the smaller risk of selection and this choice is especially important for the situation where the genetic parameters act as limiting factors for the achievement of intended genetic gains. In all the varieties the genetic gain of shell percentage was increased by restricting cocoon weight gain which this was due to either negative or low genetic correlation between cocoon weight and shell percentage.

The negative effect of restriction in index on economic efficiency was lower in *Koming1* and higher in 101433 (Figure 3). The relative efficiency of using base index to conventional index in *Koming1* was higher (96.76%). With increasing heritability of the traits, the efficiency of base index is increased and when the heritability of traits equal to unit, the base and conventional indices become similar. Bhatia and Paul (1996) have indicated that performance of selection index is slightly superior to phenotypic index and with respect to the ease in fitting, phenotypic index may be advocated for such situations.

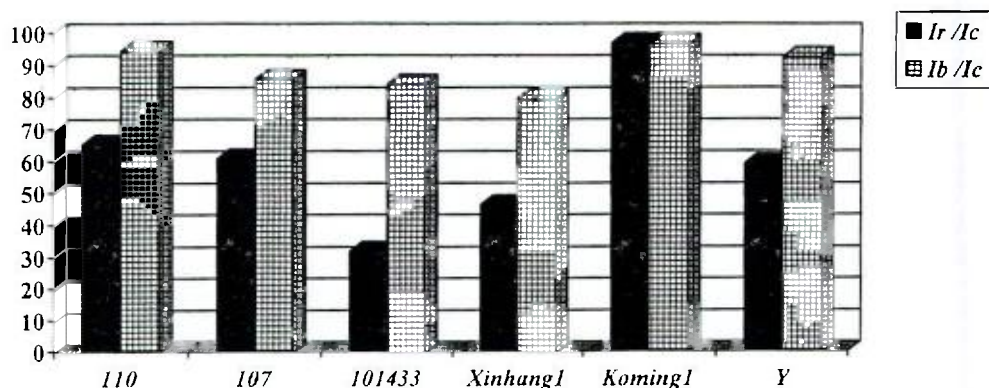


Figure 3. Relative efficiency (%) of restricted to conventional index (I_r/I_c) and base to conventional index (I_b/I_c) in improvement of economic efficiency of production system in the studied varieties.

Figure 3. Efficacité relative (%) de l'indice restreint à conventionnel (I_r/I_c) et de l'indice de base à conventionnel (I_b/I_c) pour améliorer l'efficacité économique du système de production chez les variétés étudiées.

With respect to the obtained results from this study it is concluded that commercial silkworm pure lines are reproduced and multiplied under a close (intra- line) mating system. Furthermore, their genetic parameters (because of different gene frequencies) and economic values (because of different production factors such as traits' mean and economic parameters) of characteristics are different. Thus a separate breeding strategy must be designed in the varieties and different selection index should be constructed. Also economic characters have high heritability showing that individual index selection can be performed efficiently to improve important traits in a few generations. One of the reasons possibly is that all the varieties are reared in a standard condition and environmental factors have insignificant effects on phenotypic variation of the traits. It is suggested that more studies should be carried out to know effect of index selection on commercial hybrid performance, also more discussion on modeling to derive economic values and its relation with genetic economic gains.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Mr. M. R. Gholami, previous senior researcher of Iran Silkworm Research Center (ISRC), for providing facilities for rearing of studied varieties.

REFERENCES

- AKBAR, M. K., GYLES, N. R. & BROWN, C. J. 1986. Theory and applications of selection indices for the improvement of modern poultry stocks. Division of Agriculture. University of Arkansas Bulletin 885.
- BHATIA, V. K. & PAUL, A. K. 1996. Empirical comparison of different selection strategies for genetic improvement. Indian Journal of Animal Sciences. 66: 1026-1032.
- ESCAP. 1993. Principles and techniques of silkworm breeding. New York, United Nations.

REFERENCES

- AKBAR, M. K., GYLES, N. R. & BROWN, C. J. 1986. Theory and applications of selection indices for the improvement of modern poultry stocks. Division of Agriculture. University of Arkansas Bulletin 885.
- BHATIA, V. K. & PAUL, A. K. 1996. Empirical comparison of different selection strategies for genetic improvement. Indian Journal of Animal Sciences. 66: 1026-1032.
- ESCAP. 1993. Principles and techniques of silkworm breeding. New York, United Nations.
- GHANIPOOR, M. 2002. Determination of selection indices for three Iranian commercial silkworm varieties. M.Sc. Thesis, University of Guilan, Rasht, Iran.
- HARRIS, P. L. 1970. Breeding for efficiency in livestock production: Defining the economic objectives. Journal of Animal Sciences. 30: 860-865.
- HARRIS, D. L. & NEWMAN, S. 1992. How does genetic evaluation become economic improvement? In Proceeding of Symposium on Application of Expected Progeny Differences to Livestock Improvement 84th Annual Meeting. American Society of Animal Science. Pittsburgh, Pennsylvania. August 9-11.
- KUMAR, P., BHUTIA, R. & AHSAN, M. M. 1995. Estimates of genetic variability for commercial quantitative traits and selection indices in bivoltine races of mulberry silkworm (*Bombyx mori* L.). Indian Journal of Genetics and Plant Breeding. 55: 109-116.
- KUMARESAN, P., SINHA, R. K., SAHNI, N. K. & SEKAR, S. 2000. Genetic variability and selection indices for economic quantitative traits of multivoltine mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. genotypes. Sericologia. 40: 595-605.
- LEIRI, S., NOMURA, T., HIROOKA, H. & SATOH, M. 2004. A comparison of restricted selection procedures to control genetic gains. Journal of Animal Breeding and Genetics. 121: 90-100.

COMPARAISON DE DIFFERENTS INDICES DE SELECTION POUR L'AMELIORATION GENETIQUE DES CARACTERES ECONOMIQUES CHEZ LE VER A SOIE (*BOMBYX MORI* L.)

M. GHANIPOOR¹, S. Z. MIRHOSSEINI², A. SHADPARVAR², A. R. SEIDAVI^{3*} & A. R. BIZHANNIA

1. Iran Silkworm Research Center, Rasht, Iran.

2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Iran.

3. Islamic Azad University, Science and Research Branch, Iran.

Nous avons analysé les paramètres génétiques et les valeurs économiques de certains caractères importants chez six lignées commerciales pures du ver à soie (110, 107, 101433, Xinhong1, Koming1 et Y) et nous avons mis au point des indices de sélection pour ces caractères. Nous avons estimé les valeurs économiques pour ces caractères par la méthode de simulation des données en utilisant un modèle déterministe. Nous avons procédé aux enregistrements individuels pour le poids du cocon, le poids de la coque sur six générations. Nous avons estimé l'héritabilité et les coefficients économiques par la méthode REML. L'héritabilité pour le poids du cocon et le poids de la coque est plus élevée que l'héritabilité pour la richesse soyeuse. Chez chaque variété, nous avons construit trois indices de sélection dont l'indice conventionnel, l'indice restreint et l'indice de base. La restriction du gain génétique pour le poids du cocon entraîne la diminution de l'efficacité économique. L'effet négatif de l'indice de restriction chez la lignée Koming 1 est plus faible en raison de la corrélation génétique plus faible entre le poids du cocon et le poids de la coque et il en résulte un effet moins important du gain génétique pour le poids de la coque. Les résultats obtenus dans cette étude montrent qu'il faut concevoir une stratégie de lignage séparée et construire un indice de sélection différent en fonction des variétés.

INTRODUCTION

Le but du lignage du ver à soie est d'améliorer les caractères économiques pour augmenter le profit pour les producteurs de cocons et les autres secteurs de l'industrie séricicole. En sériciculture, de nombreux caractères sont considérés comme importants. L'importance de ces caractères dans les différents secteurs de cette industrie varie. Comme l'importance économique des différents caractères n'est pas semblable, il faudrait donc principalement s'attacher aux caractères qui ont le plus de valeur pour l'efficacité économique du système de production. L'utilisation d'un indice de sélection pour l'amélioration génétique et économique des caractères sur la durée la plus courte permet les meilleures améliorations (Harris, 1970).

Quelques études ont été réalisées pour déterminer de meilleurs indices de sélection en fonction des caractéristiques importantes. On a beaucoup utilisé la méthode de l'indice de sélection qui incorpore des paramètres génétiques, phénotypiques et économiques pour déterminer l'intensité de la sélection dans le lignage du bétail (Harris et Newman, 1992). Kumaresan et coll., (2000) ont réalisé

* Auteur auquel adresser la correspondance : Alireza Seidavi, House No. 180 - Vali Asr Alley - Chamran Avenue - Rasht - Gilan - Iran. Code postal 41857-43999. Email : alirezaseidavi@yahoo.com

un programme d'indices de sélection pour les caractères quantitatifs de 56 races de ver à soie polyvoltines qui a débouché sur trois groupes de dix génotypes avec des valeurs d'indice à utiliser dans l'hybridation. Dans une autre étude (Kumar et coll., 1995), on a déterminé des indices de sélection pour 46 races bivoltines.

Le but de cette étude est de déterminer des indices de sélection pour le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse chez 6 lignées pures de vers à soie et de comparer l'efficacité de différents indices de sélection chez ces variétés.

MATERIELS ET METHODES

Cette étude a été réalisée chez 6 lignées pures produites au Centre de Recherche sur le Ver à Soie en Iran, comprenant *Xinhong1*, 107 et 101433 (d'origine japonaise) et 110, *Koming1* et *Y* (d'origine chinoise). La technique d'élevage du ver à soie utilisée est celle du système d'élevage par lot unique. On suit la procédure habituelle pour l'alimentation et les autres conditions d'élevage des larves (ESCAP, 1993). Pour estimer les paramètres génétiques et environnementaux pour le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse, on utilise les données provenant de 6 périodes d'élevage ou générations (3 saisons d'élevage au printemps et 3 saisons d'élevage en automne) ainsi qu'une population de base (80 cocons mâles et 80 cocons femelles pour chaque lignée). Pour chaque lignée et chaque génération, on élève 24 familles de sorte qu'on enregistre les données pour 30 cocons mâles et 30 cocons femelles frères pour les caractères des cocons par famille. Au total, la taille des données utilisées pour estimer les paramètres génétiques est de 8 800 enregistrements par lignée pour chaque caractère. On estime les composants de variance et de covariance avec la méthode de probabilité maximum restreinte (REML) par l'algorithme libre dérivé d'après les données complètes sur les frères sœurs dans un modèle pour animal à 3 caractères et on dégage les corrélations génétiques, environnementales et phénotypiques ainsi que l'héritabilité des caractères.

Pour calculer les valeurs économiques, on adopte la méthode de simulation des données par l'analyse du système. Dans cette méthode, en utilisant un modèle mathématique, on explique les relations entre les profits, les coûts, et en général les composantes du système de production et cela s'appelle l'équation de profit. Les références présentent plus d'informations sur la manière de dégager les valeurs économiques (Ghanipoor, 2002).

Les indices de sélection calculés comprennent l'indice conventionnel, l'indice restreint (pour restreindre l'amélioration du poids du cocon) et l'indice de base. La source d'information pour l'indice conventionnel inclut des informations individuelles pour les trois caractères. Les coefficients de l'indice conventionnel sont calculés à partir de l'équation suivante :

$$b = P^{-1}Gv \quad [2]$$

Dans l'équation ci-dessus, P est la matrice $m \times n$ de la covariance phénotypique entre les sources pour l'enregistrement, G est la matrice $m \times n$ des covariances génétiques additives entre les sources pour l'enregistrement et les valeurs génétiques additives de l'animal pour les caractéristiques actuelles de l'ensemble du génotype et v est le vecteur $n \times 1$ des valeurs économiques pour le caractère (m et n sont respectivement le nombre de sources enregistrées avec l'indice de sélection et le nombre de caractères visés dans l'objectif de lignage).

On calcule les coefficients de l'indice de sélection dans l'indice restreint (que l'on a formé pour limiter le gain génétique du poids du cocon) d'après l'équation suivante (Akbar et coll., 1986) :

$$b = [I_d - P^{-1}GC_r(C_r'G'P^{-1}GC_r)^{-1}C_r'G']P^{-1}Gv \quad [3]$$

Dans l'équation ci-dessus I_d est la matrice d'identité $m \times n$ et C_r est un vecteur zéro $n \times 1$ égal à un qui pour la rangée du poids du cocon (le caractère qui a été restreint). La sélection dans l'indice de base (I_{bp}) s'appuie sur le propre phénotype individuel corrigé (corrigé pour les effets fixes) et en conséquence, le vecteur des coefficients de l'indice et les valeurs économiques sont égaux. Cela signifie :

$$I_b = v'x \quad [4]$$

Le changement escompté pour les valeurs génétiques additives moyennes des caractères (R_g) et aussi le gain escompté pour l'efficacité économique du système de production (R_H) sont calculés d'après les équations suivantes :

$$R_g = i \frac{b'G}{\sigma_I} \quad [5]$$

$$R_H = ir_{H,I} \sigma_H \quad [6]$$

où σ_I et σ_H sont l'indice de sélection et les écarts type agrégés pour l'ensemble du génotype, $r_{H,I}$ est la justesse de la sélection et i est l'intensité de sélection qui est considérée comme unité.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les valeurs économiques pour les caractères sont présentées dans le Tableau I. On construit les indices de sélection en utilisant les paramètres génétiques (Figures 1 et 2) et les valeurs économiques (Tableau I). Dans le Tableau II, les changements génétiques escomptés pour les caractères sont présentés après une génération de sélection par les indices. Avec les indices conventionnels et de base, le gain escompté pour le poids de la coque est plus élevé chez 101433 et avec l'indice restreint, l'amélioration pour ce caractère est plus importante chez *Koming1*. Le gain génétique escompté le plus élevé pour la richesse soyeuse est lié à la lignée *Koming1*. L'amélioration génétique escomptée pour le poids du cocon chez la lignée 101433 est plus élevée en raison de l'héritabilité plus élevée et de la corrélation avec le poids du cocon. Par conséquent, l'amélioration la plus importante pour le poids de la coque chez 101433 est due à son héritabilité et à sa corrélation plus importante avec le poids du cocon.

Par conséquent, on prévoit qu'en restreignant l'amélioration génétique au poids du cocon chez la lignée 101433, cela entraîne une diminution considérable du gain pour le poids de la coque. Puisque le poids de la coque est le caractère économique le plus important, la baisse de l'amélioration pour ce caractère entraîne une perte économique importante. L'effet négatif de l'indice de restriction sur l'efficacité de la sélection chez *Koming1* est moins important en raison de la corrélation génétique plus faible entre le poids du cocon et le poids de la coque et par conséquent, cela a un effet moins important sur le gain génétique pour le poids de la coque. Leiri et coll., (2004) ont suggéré qu'il faut toujours préférer la sélection BLUP à la sélection restreinte BLUP en raison du plus petit risque de sélection et ce choix est surtout important dans la situation où les paramètres génétiques agissent comme des facteurs limitatifs pour l'obtention des gains génétiques désirés. Chez toutes les variétés, le gain génétique pour la richesse soyeuse augmente en restreignant le gain pour le poids du cocon, ce qui est dû à une corrélation négative ou faible entre le poids du cocon et la richesse soyeuse.

L'effet négatif de la restriction dans l'indice d'efficacité économique est plus faible chez *Koming1* et plus élevé chez 101433 (Figure 3). L'efficacité relative de l'utilisation d'un indice de base à conventionnel chez *Koming1* est plus élevée (96,76 %). Avec l'augmentation de l'héritabilité des caractères, l'efficacité de l'indice de base augmente et quand l'héritabilité des caractères est égale à l'unité, les indices de base et conventionnels deviennent similaires. Bhatia et Paul (1996) ont indiqué

que la performance de l'indice de sélection est légèrement supérieure à celle de l'indice phénotypique et en raison de sa facilité d'utilisation, on peut recommander l'indice phénotypique pour de telles situations.

En ce qui concerne les résultats obtenus dans cette étude, on en conclut que les lignées pures commerciales du ver à soie se reproduisent et se multiplient dans le cadre d'un système d'accouplement rapproché (intra-lignées). De plus, les caractéristiques de leurs paramètres génétiques (en raison des différentes fréquences des gènes) et de leurs valeurs économiques (en raison de différents facteurs de production tels que la moyenne des caractères et les paramètres économiques) sont différentes. Il faut donc concevoir une stratégie de lignage séparée et construire un indice de sélection différent chez les lignées. Tous les caractères économiques ont aussi une héritabilité élevée, ce qui montre que l'on peut procéder efficacement à la sélection d'un indice individuel pour améliorer des caractères importants en quelques générations. L'une des raisons possibles est que toutes les variétés sont élevées dans des conditions habituelles et les facteurs environnementaux ont des effets insignifiants sur la variation phénotypique des caractères. Il faudrait entreprendre plus d'études pour connaître l'effet du choix de l'indice sur la performance commerciale de l'hybride et plus de discussions sur la modélisation pour dégager les valeurs économiques et sur sa relation avec les gains économiques génétiques.

BIOLOGICAL CONTROL OF ROOT ROT PATHOGENS IN MULBERRY BY ANTAGONISTIC BACTERIA

MOSTAPHA NIKNEJAD KAZEMPOUR¹, ESMAEIL KAMRAN² & AFSANEH MERAT²

1- Department Plant Pathology, Faculty of Agricultural Sciences, Guilan University,
P.O. Box. 41635-1314 Rasht – Iran, E-mail : nikkazem@yahoo.fr,
Tel : 00981316690009, Fax :0098 1316690281.
2- Center of Silkworm Research, Rasht-Iran.

In this research, effect of some isolates of antagonistic bacteria were investigated against the causal agent of root rot of mulberry like *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Lasiodiplodia theobromae*, and *Rhizoctonia solani* were collected from orchards of mulberry in the Guilan Province, Iran, under *in vitro* and greenhouse conditions. Three hundred and sixty five bacterial isolates, separated from the rhizosphere of mulberry infected by the fungi mentioned above and antagonistic ability of 5 isolates of these bacteria (3 gram negative and 2 gram positive) were demonstrated by using the dual culture method. According to the results of biochemical and morphological trials, 3 isolates: M30, M39 and M163 were identified as *Pseudomonas fluorescens*. Two isolates, M163 and P15 were introduced as *Bacillus cereus*. In determining the effects of volatile metabolites produced by antagonistic bacteria, all strains, inhibited the growth of the causal agent of root rot of mulberry, in *in vitro* conditions. Culture filtrate and antibiotics produced by these strains inhibited growth of the pathogens. All antagonistic isolates produced siderophore on King's B contained 5, 15, 25 and 50 $\mu\text{mol FeCl}_3$ which inhibited the growth of *Geotrichum candidum*. Effect of fungicides Rovral T.S on strains of antagonistic bacteria indicated that these fungicides had some effect on strains when used in 1000 ppm. The bacteria colonization experiment with antagonistic strains increased their populations on mulberry root system. In greenhouse conditions antagonistic isolates were used by plants and soil drenching. Statistical analysis of data indicated that there existed significant differences between plant treatments and control. The isolate was most effective and disease incidence on *F. solani*, *F. oxysporum*, *L. theobromae*, and *Rhizoctonia solani* by 21.5, 26.5, 25 and 29 % respectively. The results of the use of the mixed Rovral T.S. fungicide with mixed antagonistic isolates showed that there existed significant disease incidence by 16.5, 21, 21 and 24 % respectively. These results suggest that the *P. fluorescens* and *B. cereus* isolates studied have an excellent potential to be used as biocontrol agents of root rot of mulberry.

Keywords: Root rot, mulberry, antagonistic bacteria.

INTRODUCTION

Mulberry, a woody plant belonging to the genus *Morus alba*, family Moraceae, is widely distributed around the world. Mulberry foliage is the only food for the silkworm (*Bombyx mori*) and it is grown under varied climatic conditions ranging from temperate to tropics. Mulberry leaf is a major economic component in sericulture since the quality and quantity of leaf produced per unit area has a direct bearing on cocoon harvest (Datta, 2001). The nutritional quality of mulberry has a predominating influence on the growth and development of the larvae of *B. mori* and subsequently on cocoon crop production (Krishnaswami, 1978). Control of the disease has been a major problem in mulberry cultivation. It is essential for developing effective control techniques to investigate the

ecological characteristics of the disease. However, no substantial studies have been carried out on these aspects, although several brief reports have been published (Hara, 1925; Kimura, 1979). In addition, integrated control techniques including chemical and biological control have recently been developed from an ecological and economic point of view for various plant diseases worldwide. Nevertheless, no biocontrol studies on mulberry root rot using antagonistic microorganisms had been conducted hitherto.

In this paper, we reviewed the potential biocontrol agent against root rot agents, *P. fluorescens* M30, M39 and M163 isolates and *B. cereus* M148 and PI5 strains, isolated from healthy and root rot disease of mulberry.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of root rot pathogens:

Since 2002-2004, samples were collected from orchards of mulberry in Rasht, Lahijan, Langeroud, Foman, Some-Sara and Parand of Guilan Province, Iran, for isolation of the organism causing the disease. Selected root segments, were washed by running water for 3 hours (Yoshida and Shirata, 1999), surface disinfected by immersion in a 10% sodium hypochlorite solution for 5 min., rinsed with sterilized water, dried under a laminar airflow hood, and cut into pieces (3-5 mm). The tissue pieces were placed on plates containing potato- dextrose agar (PDA, Merck) at 2 %, pH 5.6 + 0.2, amended with 8 mg/l of streptomycin sulfate, and 50 mg/l of chlortetracycline (Baird *et al.*, 1991). The plates were transferred to a controlled environment chamber at a temperature of $26 \pm 2^\circ \text{C}$. The identification of the fungi were based on morphology of their fructifications, and cultural characteristics (Booth, 1977; 1981; Gerlach and Nirenberg, 1982; Hanlin, 1991). Fungi growing from the root rot were subcultured onto PDA for identification using macroscopic and microscopic morphological characteristics. More than one fungus was often isolated from a single piece of infected tissue. Isolation frequencies based on the number of pieces of infected tissue were determined for the genera and species isolated. Single spores of cultures initially identified as *Fusarium* spp. were transferred to carnation leaf agar and identified using the classification system of Nelson *et al.*, (1983). Keys for general identification of the fungi were those developed by Ellis (1971), Sutton (1980), and Barnett and Hunter (1986). The isolates were kept in filtrate paper at -80°C .

Pathogenicity tests:

Autoclaved barley grains (300 g barley grains/100 ml distilled water) were infected with plugs of a 7-10 day-old pure culture of fungi pathogen, and incubated for 3-4 weeks until grains were covered with the fungus. Sterilized barley grains, without fungi, were used as control. Young mulberry plants (4-6 month-old) were placed in 15×18.5 cm plastic pots, one plant in each of 20 pots. Each pathogenic fungi individually infected barley grains and a commercial potted mixture (1:10 v/v, Grow Mix S1-organic substrate) was added to inoculated pot. For the control, sterilized substrate was placed in ten pots. The plants were maintained at $25-28^\circ \text{C}$ with saturated relative humidity for 48 hr. After uncovering them, the plants remained in the growth chamber at $26 \pm 2^\circ \text{C}$, and 12 hr of light on/off cycle. When foliar symptoms appeared, rotted root segments were surface disinfected, as described previously, and placed on PDA plates for reisolation of the pathogen.

Isolation of antagonistic bacteria isolates and identification:

Rhizosphere colonizing antagonistic bacteria were isolated from fresh roots of mulberry from different area of Guilan province, Iran. After vigorous shaking of excised roots to remove all but tightly adhering soil, root segment, (1 g) were shaken in 100 ml of sterile distilled water for 25 min. Fluorescent pseudomonads were isolated on King's medium B (KB). According to the methodology of Schaad *et al.* (2001), antagonistic isolates of bacteria were identified by biochemical, physiological and biological tests.

Efficacy of antagonistic bacteria isolates to inhibit root rot pathogens *in vitro*:

Root rot pathogens isolated from a diseased root rot of the mulberry cultivar Ichinose, was shown to be highly virulent isolates in a subsequent pathogenicity test. Efficacy of the antagonistic isolates in inhibiting growth of root rot were tested by streaking each bacterial isolate on one side of a Petri dish containing potato dextrose agar and nutrient agar (PDA+NA) medium. One 5-mm mycelial disc from a 5 days old culture of *F. moniliforme* on PDA+ NA was placed at the opposite side of the Petri dish. Growth of pathogenic fungi were inhibited when it grew toward the bacterial colony and the inhibition zone was measured from the edge of mycelium to the bacterial colony edge. The bacterial isolates that inhibited root rot pathogens were identified by specific tests for antagonistic bacteria (Schaad *et al.*, 2001).

Production of volatile antibiotic:

250 µl of a antagonistic bacterial suspension (1×10^8 CFU/ ml) were placed at the Petri dish containing KB, and a 5 mm mycelial disk of a four days old pure culture of pathogenic fungi were placed at the center of another Petri dish containing PDA. Both half plates were placed face to face preventing any physical contact between the pathogen and the bacterial suspension, and were sealed to isolate the inside atmosphere and to prevent the loss of volatiles formed. Plates were incubated at 26° C for 6 days and the growth of the pathogen was measured and compared to controls developed in the absence of the bioantagonist (mocked inoculation with 6 mm-disk of PDA). Each experiment considering a single bacterial isolate was run in triplicate and was repeated at least three times (Montealegre *et al.*, 2003). Results are expressed as means of inhibition (%) of the growth of pathogenic fungi in the presence and absence of any bacterial isolate. Percent inhibition was calculated using the following formula (Montealegre *et al.*, 2003).

$$\text{inhibition (\%)} = (1 - (\text{fungal growth} / \text{Control growth})) \times 100$$

Production of diffusible antibiotic:

This effect was tested according to Montealegre *et al.* (2003), PDA plates, covered with a cellophane membrane, were inoculated in the center with 250 µl of a bioantagonistic bacterial suspension (1×10^8 CFU/ ml). After incubation for 48 hrs at 26° C, the membrane with the grown bacterial isolate was removed, and the plate was inoculated in the middle with a 5 mm disk of a pure culture of pathogenic fungi plates were later incubated at 26° C for 7 days and the growth of the pathogen was measured. Control were run with mocked inoculated PDA containing plates on the cellophane membrane (replacing the bacterial suspension by sterile distilled water), and later incubated with root rot agents. Each experiment considering a single bacterial isolate was run in triplicates and was repeated at least three times. Results are expressed as means of % inhibition of growth of pathogenic fungi in the presence and absence of any antibio antagonistic bacterial isolate.

Extracellular secretion:

These test were performed in 250 ml Erlenmayer flasks containing 100 ml of sterile nutrient broth (NB). 1 ml bacterial suspension isolates (1×10^8 CFU/ ml) were added to the flasks containing NB. The flasks were then incubated at 26 °C for 6 days on a rotary shaker at $100 \times g$ at room temperature (26 ± 2 °C). Bacterial cells were pelleted by centrifugation at 5000 g for 12 minutes. The supernatants were sterilized with 0.22 µm filtrate. 5, 15 and 25 % (v/v) of culture filtrate were mixed with PDA and a 5 mm disk of a four days old pure culture of pathogenic fungi were placed at the center of Petri dish. The experiments were independently repeated four times. Results are expressed as means of inhibition (%) of the growth of pathogenic fungi in the presence or absence of any bacterial culture filtrate isolates.

Effect of Fe⁺³ on antagonism level:

This effect was tested according to Pumarino (1995), using $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ at 5, 15, 25 and 50 μMol concentrations added to the KB medium. For all tests, the experimental unit was one Petri dish.

Production of protease:

This effect was tested according to Maurhofer *et al.* (1995). Efficacy of the antagonistic bacteria isolates in production of protease was tested by streaking each bacterial isolate on Skim milk agar medium (SMA) on the Petri dish. Each experiment considering a single bacterial isolate was run in triplicate and was repeated four times. The bacterial isolates that produced protease were identified by a halo zone surrounding of bacterial colony and were measured (Maurhofer *et al.*, 1995).

Effect of on pathogenic fungi of root rot and antagonistic isolates *in vitro*:

This effect was tested according to Horsfall (1956). The development of antagonistic bacteria and pathogenic fungi were tested under Rovral T.S, Tecto and Benlate concentrations of 1, 3, 5, 10, 100 and 1000 ppm at room temperature ($26 \pm 2^\circ\text{C}$). For pathogenic fungi, 2 ml of each fungicides concentrations mixed with PDA at 50°C and a 5 mm disk of a five days old pure culture of pathogenic fungi was placed at the center of Petri dish containing PDA. After incubation for 7 days at 26°C the growth of the pathogen was measured. Controls were run with mocked inoculated PDA on the PDA medium (by replacing fungicide concentrations by sterile distilled water). For antagonistic isolates, the 5 mm disk of Whatman filter paper number 38, was dipped in the Rovral T.S concentrations for 2 minutes and was placed at the Petri dish containing KB. After incubation for 48 hrs at 26°C the inhibition zone was measured. Four replications per concentration were maintained. In greenhouse conditions, 1000 ppm concentration of fungicides were used for soil drenching.

Results are expressed as means of % inhibition of growth of pathogenic fungi and zone inhibition of antagonistic bacteria. Each experiment considering a single bacterial isolate was run in triplicates and was repeated at least three times.

Bacterial ability for root colonization:

Ability of bacteria to colonize roots was established according to Misaghi (1990). The young mulberry plants (4-6 month-old) were placed in 15×18.5 cm plastic pots, one plant in each of 20 pots and were inoculated with 450 ml antagonistic bacterial suspension (1×10^8 CFU/ ml) containing 1% gum. The pots were incubated for 4 months at 26°C , for evaluation, radical apex were isolated and crushed in stomacher plastic containing 5 ml distilled water sterile, and the bacterial suspension obtained was diluted. 50 μl of these dilutions were cultured on Petri dish containing KB, and incubated for 48 hrs at 26°C , and CFU were counted. The experimental unit was three replications for each antagonistic isolate. Results correspond to the mean of all experiments.

Greenhouse conditions:

Efficacy of antagonistic bacteria against root rot pathogens in the greenhouse:

For evaluation in the greenhouse, the Ichinose cultivar sensitive to root rot disease was used. Infected roots were obtained from plants artificially inoculated with pathogenic fungi. Five isolates of antagonistic bacteria isolates that inhibited root rot agents *in vitro* were tested for their efficacy to control root rot disease in the greenhouse. The inoculum of pathogenic fungi were prepared with barley grains.

Preparation of bacterial inocula:

Cells of antagonistic bacteria for use in greenhouse experiments were grown in King's medium B broth (KMB) to late exponential phase at 27°C with shaking at $100 \times \text{g}$. Cells were harvested by centrifugation ($5000 \times \text{g}$ / min., 10 C, 15 min.), washed twice and resuspended in 0.5% sterile NaCl solution. The bacterial suspension were adjusted turbidimetrically to about 1×10^8 CFU/ml for each experiment. The bacterial cells suspensions in KMB medium were used for soil drenching.

Efficacy of plant treatments with antagonistic bacteria isolates and fungicide:

In greenhouse conditions mulberry seedling (cv. Ichinose) were used, then the young mulberry plants (4-6 month-old) were dipped in the antagonistic bacterial suspensions (1×10^8 CFU/ml) in 1% methyl cellulose for 2 hrs. Inoculum of pathogenic fungi of root rot separately were added to soil in pots. Then, soil in pot was drenched with suspensions of the antagonistic bacteria isolates and fungicides at a total concentration of 1×10^8 CFU/ml and 1000 ppm respectively. The pots were covered with plastic film and incubated 48 hrs at room temperature then young mulberry plants (4-6 month-old) were placed in plastic pots, (one plant in each pot), and were maintained in the greenhouse under $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and relative humidity of 95%. Control treatments were inoculated with sterile distilled water. The young mulberry with root rot disease symptoms were recorded 4 months after planting. Plants were arranged in a randomized completed block design with five replications. Root rot disease intensity was assessed 120 days after pathogenic fungi inoculation.

Statistical analysis:

The incidence and severity of decay were analyzed by an analysis of variance (ANOVA) using SAS Software (SAS Institute, version 6.08, Cary, NC). Statistical significance was judged at the level $P < 0.01$. When the analysis was statistically significant, Duncan's Multiple-Range Test (SSR Test) was used to test mean separations among mean values of each treatment.

RESULTS

Pathogenicity test of pathogenic fungi on mulberry:

After three months mulberry seedling (cv. Ichinose) showed root rot disease symptoms. Based on morphological and pathogenicity test characters the following fungi were identified: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *L. theobromae*, and *R. solani* agent of root rot.

Isolation of antagonistic bacteria:

Three hundred sixty five bacterial isolates, were initially collected from the rhizoplane and rhizosphere of disease affected mulberries in orchards of different areas of the Guilan province-Iran. Among them, five isolates were found to inhibit growth of root rot agents *in vitro*. Three isolates, M30, M39 and M163 were identified as *Pseudomonas fluorescens* and two isolates, M163 and PI5 were introduced as *Bacillus cereus*, according to the methodology of Schaad *et al.* (2001).

Efficacy of antibiosis of antagonistic isolates to inhibit pathogenic fungi *in vitro*:

Dual culture:

No physical contact was observed between any of the antagonistic bacteria tested and root rot pathogenic fungi; moreover, an inhibitory halo was observed suggesting the presence of fungistatic metabolites secreted by the bacteria. On the other hand, a change in mycelial color was observed closed to the colony end of pathogenic fungi, being this one of a darker brown than the one observed at the center of colony. Microscopy observation of this zone, allowed to detect cytoplasmic leakage that could be observed up to the hyphal septum, resulting in deformation and sliming of their apex up to 1/5 of its original size. *B. cereus* PI5 was the most inhibited of all fungi pathogens (Table 1).

Volatile antibiotics:

All antagonistic isolates were showed there are significant difference with control ($P < 0.05$). *P. fluorescens* M39 and *B. cereus* PI5 were the antagonistic bacteria isolate that showed the best inhibitory effect on the growth of root rot agents. The inhibition % of *P. fluorescens* M39 and *B. cereus* PI5 of antagonistic isolates were 62 and 66 percent respectively (Table II).

Table I. Effect of dual culture of antagonistics isolates on root rot agents of mulberry *in vitro*.**Tableau I. Effet de la culture double d'isolats antagonistes sur des agents du pourrissement de la racine chez le mûrier *in vitro*.**

	Inhibition zone (mm) / Zone d'inhibition (mm) Antagonistics isolates / Isolats antagonistes				
	M30	M39	M163	M148	PI5
<i>Fusarium oxysporum</i>	43 b	47.5 a	43.5 b	42.5 b	48 a
<i>Fusarium solani</i>	39.5 b	40.5 b	41 b	39 b	45 a
<i>Lasiodiplodia</i>	53 b	54 b	55 b	56 b	63 a
<i>Rhizoctonia solani</i>	51 b	51.5 b	51.5 b	51 b	60 a

Means followed by a common letter in a row are not significantly different according to LSD (T) test at $P \leq 0.05$. /
 Les moyennes suivies par une lettre commune dans une rangée ne présentent pas de différence significative selon
 le test LSD (T) au seuil de $P \leq 0.05$.

Table II. Effect of volatile antibiotics of antagonistic isolates on radial growth of root rot agents of mulberry *in vitro*.**Tableau II. Effet d'antibiotiques volatiles d'isolats antagonistes sur la croissance radiale *in vitro* d'agents du pourrissement de la racine chez le mûrier.**

	Inhibition (%) / % d'inhibition Antagonistic isolates / Isolats antagonistes				
	M30	M39	M163	M148	PI5
<i>Fusarium oxysporum</i>	46.5 c	49.5 b	46 c	47 c	55 a
<i>Fusarium solani</i>	42.5 c	47.5 b	44 c	42 c	53 a
<i>Lasiodiplodia</i>	49 c	56.5 b	47.5 c	48 c	63 a
<i>Rhizoctonia solani</i>	56 c	62 b	56 c	57 c	66 a

Means followed by a common letter in a row are not significantly different according to LSD (T) test at $P \leq 0.05$. /
 Les moyennes suivies par une lettre commune dans une rangée ne présentent pas de différences importantes
 selon le test LSD (T) au seuil de $P \leq 0.05$.

Diffusible antibiotics :

Similar results were obtained when the effect of diffusible antibiotic was tested. Isolates M39 and P15 were those which most inhibited all root rot pathogenic fungi, while the diffusible antibiotics of isolate M30 were those which less inhibited the growth of all pathogenic fungi (Table III).

Table III. Effect of antibiotics of antagonistics isolates on radial growth of root rot agents of mulberry *in vitro*.

Tableau III. Effet d'antibiotiques d'isolats antagonistes *in vitro* sur la croissance radiale d'agents du pourrissement de la racine chez le mûrier.

	Inhibition (%) / (%) d'inhibition Antagonistics isolates / Isolats antagonistes				
	M30	M39	M163	M148	P15
<i>Fusarium oxysporum</i>	40 b	40.5 b	38 b	39.5 b	52 a
<i>Fusarium solani</i>	42.5 b	43.5 b	44 b	42 b	48 a
<i>Lasiodiplodia</i>	54 b	54.5 b	55.5 b	55 b	63 a
<i>Rhizoctonia solani</i>	56 b	57 b	58 b	59 b	66 a

Means followed by a common letter in a row are not significantly different according to LSD (T) test at $P \leq 0.05$.
/ Les moyennes suivies par une lettre commune dans une rangée ne présentent pas de différence importante selon le test LSD (T) au seuil de $P \leq 0,05$.

Extracellular secretion:

All antagonistic isolates showed that there are significant different between isolates and concentration of juices ($P < 0.05$). *P. fluorescens* M39 and *B. cereus* P15 had a suppressive effect on root rot agents of mulberry *in vitro* conditions (Table IV).

Production of protease:

All antagonistic isolates were able to produce protease on SMA medium. Among isolates, *P. fluorescens* M39 and *B. cereus* P15 were found most effective which had 28 mm of halo zone surrounding bacterial colony. All of the five isolates were able to secrete the enzymes involved in biocontrol, and that all had the ability to control all root rot agents through secretion of diffusible and volatile metabolites, it may be concluded that they use these two latter mechanisms of biocontrol as opposite to some fungi biocontrol microorganisms that also use fungi cell wall hydrolyzing enzymes within their biocontrol mechanisms (Pérez *et al.*, 2002).

Siderophore:

The five antagonistic bacteria showed similar behaviour on all root rot pathogens growth at any of the Fe^{+3} concentration tested.

Table IV. Effect of Secretion of extra- cellular (15% v/v) of antagonistics isolates on radial growth of root rot agents of mulberry *in vitro*

Tableau IV. Effet de la sécrétion d'isolats antagonistes extra-cellulaires (15 % v/v) sur la croissance radiale in vitro d'agents du pourrissement de la racine chez le mûrier.

	Inhibition (%) / % d'inhibition Antagonistic isolates / Isolats antagonistes				
	M30	M39	M163	M148	PI5
<i>Fusarium oxysporum</i>	39 c	45 b	39.5 c	38 c	51.5 a
<i>Fusarium solani</i>	39.5 c	45.5 b	38 c	40 c	49 a
<i>Lasiodiplodia</i>	51 c	59.5 b	51.5 c	51 c	64 a
<i>Rhizoctonia solani</i>	53 c	59 b	55 c	54 c	66 a

Means followed by a common letter in a row are not significantly different according to LSD (T) test at $P \leq 0.05$.
/ Les moyennes suivies par une lettre commune dans une rangée ne présentent pas de différence très importante selon le test LSD (T) au seuil de $P \leq 0.05$.

Table V. Effect of antagonistic bacteria isolates and Rovral T. S to suppression root rot agents of mulberry in greenhouse.

Tableau V. Effet des isolats de bactéries antagonistes et du Rovral T. S. sur la suppression des agents du pourrissement de la racine chez le mûrier sous serre.

	Disease incidence (%) / Incidence de la maladie Root rot agents / Agents du pourrissement de la racine			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>R. solani</i>
M30	26.5 b	33 b	30 b	33 b
M39	23.5 c	29 c	26 c	30 c
M163	26.75 b	33.5 b	31 b	34.5 b
M148	27.5 b	34 b	31.5 b	35c
PI5	21.5 d	26.5 d	25 c	29 c
M39 + PI5	20 dc	25 d	24 c	27.5 dc
Rovral T.S	19.5 dc	25 d	23.5 c	27 dc
Rovral T.S + M39+ PI5	16.5 e	21 e	21 d	24 d
Control / Témoin	70 a	70 a	70 a	70 a

Means followed by a common letter in a column are not significantly different according to LSD (T) test at $P \leq 0.05$. / Les moyennes suivies par une lettre commune dans une colonne ne présentent pas de différences très importantes selon le test LSD (T) au seuil de $P \leq 0.05$.

Colonization of mulberry roots by antagonistic bacteria:

During the 2 months of growth in pot, significant differences were seen between the numbers of bacteria (CFU/g of roots) on mulberry roots for all isolates. The counts of each isolate were $5.3 - 5.55 \log \text{ CFU/g}$ of roots 1 day after inoculation and they were increased at the level after 2 months $6.5 - 7.2 \times 10^8 \text{ CFU/g}$ of roots. During further growth in non-sterile soil in pots in the greenhouse, they were still at the same level $8.38 - 8.65 \log \text{ CFU/g}$ of roots 4 months after inoculation.

Greenhouse conditions:

In greenhouse conditions, statistical analysis of data on the disease incidence % by root rot agents, indicated that there existed significant differences between plant treatment and control. Among these five isolates, *P. fluorescens* M39 and *B. cereus* P15 were the most effective for control of root rot disease. The disease incidence on *R. solani* in M39 and P15 isolate were 34.5 and 29 % respectively, while the control plants showed 70 % disease incidences (Table V). The results of the use of the mixture of isolates (M39 and P15) showed that there existed significant differences between application of a mixture of these antagonistic isolates and the use of these isolates alone. Maximum control was obtained when M39 and P15 suspensions were added to Rovral T.S (Table V).

During the 120 days of growth of the mulberry seedling in the pot, significant difference were seen between the antagonistic isolates and control on disease incidence for all treatments (all root rot agents), also there are no significant differences between the application of the mixture of these isolates and the application of Rovral T.S in all treatments. Maximum control in greenhouse with disease incidence of 16.5 % was obtained when M39 and P15 suspensions were added to Rovral T.S on mulberry plants that were inoculated with *F. oxysporum*. (Table V).

DISCUSSION

In recent years, antagonistic bacteria have drawn attention worldwide because of the production of secondary metabolites such as siderophore, antibiotics volatile compounds HCN, enzymes and phytohormones. Although isolates of *P. fluorescens* and *B. cereus* could be obtained from the rhizosphere of different mulberry orchards, antagonistic potential of these isolates appears to vary a great deal (Wilson *et al.*, 1992; Hagedron *et al.*, 1989). *P. fluorescens* and *B. cereus* isolates were shown to inhibit root rot agents effectively

The ability of *P. fluorescens* and *B. cereus* isolates to serve as biocontrol agent of root rot agents is described here. The results of dual culture studies showed that *P. fluorescens* and *B. cereus* isolates inhibited the growth of root rot agents on plates. Members of the genus *Pseudomonas* spp. are well known antagonistic fungi (Gasoni *et al.*, 1998). They are known to produce volatile compounds such as hydrogen cyanide (Castric and Castric 1983). Production of HCN, fluorescent siderophores and proteases were detected among the possible factors involved in the biocontrol activity of these strains (Bagnasco *et al.*, 1998; Bajsa *et al.*, 1999). The production of antibiotics has been demonstrated to be a widespread mechanism exerted by microorganisms to control a wide variety of phytopathogens. Particularly among fluorescent *Pseudomonas*, the production of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), Plt (pyoluteorin), Prn (pyrrolnitrin) and different derivatives of phenazine has been described (Thomashow and Weller, 1996).

It is also worth noticing that the selection of these five native strains was based on their antagonistic ability against phytopathogens, and not following physiological or genetical patterns. This constitutes another contribution to support the fact that antibiotic production from biocontrol bacteria in soil is a widespread phenomenon all around the world. The strain *Pseudomonas fluorescens* CFBP 2392 showed antagonistic activity *in vitro* against *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora parasitica*. However inhibition of the latter pathogen was not associated with important effects on hyphal structure or cell contents (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1999).

Both direct inhibition of the pathogen and systemically induced resistance in the mulberry plants could be involved in control (Lemanceau and Albouvette, 1993). From all these results it may be concluded that the biocontrol effect of antagonistic bacteria isolated from rhizosphere of healthy and root rot disease of mulberry against root rot agents are adequate to be used at the mulberry orchards in different areas of Iran. The low disease incidence of root rot disease with P15 isolate suggests that the antibiotics metabolites are conducive for rapid inhibition of agents. The multiple activity may be useful under natural conditions in which the same crop suffers from disease other than root rot disease of mulberry. This study demonstrated the possibility of controlling root rot mulberry by using antagonistic bacteria.

REFERENCES

- BAGNASCO P., De LA FUENTE L., GUALTIERI G., NOYA F. & ARIAS A. (1998) Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1317-1322.
- BAIRD R. E., BRENNEMAN T. B., BELL D.K. & MURPHY A. P. (1991) The effect of the fungicide propiconazole (Tilt) on the groundnut shell mycobiota. *Mycol. Res.* 95:571.
- BAJSA N., DE LA FUENTE L., QUAGLIOTTO L., LEMANCEAU P. & ARIAS A. (1999) Factores antifúngicos producidos por una cepa de *Pseudomonas fluorescens* promotora del crecimiento vegetal. XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Mendoza, Argentina.
- BARNETT H.L. & HUNTER. B. B. (1999) Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS Press. 218 pp.
- BOOTH C. (1971) The Genus *Fusarium*. (Commonwealth Mycological Institute: Kew, Surrey, England).
- BOOTH C.H. (1977) *Fusarium*: Laboratory Guide to the Identification of major species, Kew, Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute.
- BOOTH C.H. (1981) Perfect states (teleomorph) of *Fusarium* species PP. 446-52. In : P. E. Nelson T. A. Toussoun and R. J. Cook (eds), *Fusarium* : disease, Biology, and Taxonomy. University Park : Pennsylvania State University Press, 457 pp.
- CASTRIC K.F. & CASTRIC P. (1983) Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 45, 701-702.
- DATTA R.K. (2001) Mulberry Cultivation and Utilization in India. FAO Electronic Conference on Mulberry for Animal Production.
- ELLIS M. B. (1971) Dematiaceous Hyphomycetes Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 607 pp.
- GASONI L., COZZI J., KOBAYASHI K., YOSSEN V., ZUMELZU G. & BABBIT S. (1998) Suppressive effect of antagonistic agents on *Rhizoctonia* isolates on lettuce and potato in Argentina field plots. In 'International Congress of Plant Pathology'. (7, 9th-16th August, 1998, Edinburgh, Scotland). 1998. 5.2.44.
- GERLACH W. & NIRENBERG H. (1982) The genus *Fusarium* – A Pictoria Atlas. Mitt. Biol. Bundesanst. Land – Forstwirtschaft. Berlin – Dahlem. 209 : 1 – 406.
- GIANINAZZI-PEARSON V., ARNOULD C., CORBELAND T., LEMANCEAU P. & BUDI S. W. (1999) Reduction of the chemical inputs in a vegetable crop by the use of beneficial rhizospheric microorganisms. INCO-DC. Second Annual Report.
- HAGEDRON C., GOULD W.D. & BRADINELLI T.R. (1989) Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 55, 2793-2397.
- HANLIN R.T. (1991) Icones ascomycetum venezuelae: *Phyllachora fusicarpa*. *Mycotaxon*. 41:19-16.
- HARA K. (1925) Pathology of practical crops. Youkendo, Tokyo, 148–149 [In Japanese].

- KIMURA K. (1979) The illustration of mulberry diseases in Japan. Kenpakusya, Tokyo, 79–80 [In Japanese].
- KRISHNASWAMI S. (1978) New technology of silkworm rearing. Central Sericulture Research and Training Institute. India, Bull. no. 2, pp 4.
- LEMANNCEAU P. & ALBOUVETTE C. (1993) Suppression of Fusarium wilt by fluorescent pseudomonads ; mechanisms and application. Biocontrol Science Technol. 3, 219-223.
- MONTEALEGRO J.R., REYES R., PEREZ R., HERRERA L.M., SILVA P. & BESOAIN X. (2003) Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. Journal of Biotechnology. 6, 115-127.
- NELSON P. E., TOUSSOUN T. A. & MARASAS W.F.O. (1983) *Fusarium* species : An illustrated manual for identification. Pennsylvania state University press, University Park.
- PEREZ L.M., BESOAIN X., REYES M., PARADO G. & MONTEALEGRE J. (2002) The expression of extracellular fungal cell wall hydrolytic enzymes in different *Trichoderma harzianum* isolates correlate with their ability to control *Pyrenochaeta lycopersici*. Biological Research. 35, 401-410.
- SCHAAD N. W., JONES J.B. & CHUN W. (2001) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Thrid eds. APS. St. Paul. Minnesota, USA. 373 pp.
- STAINER R.Y., PALLERONI N. J. & DOUDORFF M. (1996) The aerobic Pseudomonas, a taxonomic study. Japanese Plant Pathology. 98, 139-139.
- SUTTON B. C. (1980) The coelomycetes. Commonwealth Mycological Institute: Kew, Surrey, U. K.
- THOMASHOW L.S. & WELLER D. M. (1996) Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: Plant-Microbe Interactions, Vol. 1. Eds. Stacey, G. and Keen, N., pp. 187-235. Chapman & Hall, New York, USA
- YOSHIDA S. & SHIRATA A. (1999) Survival of *Colletotrichum dematium* in soil and infected mulberry leaves. Plant Dis., 83: 465–468.
- WILSON H., EPTON H. A. S. & SIGEE D. C. (1992) Biological control of fire blight of Hawthorn with fluorescent *Pseudomonas* spp. under protected conditions. Journal of . Phytopathology. 136, 16-26.

LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES PATHOGENES DU POURRISSEMENT DE LA RACINE CHEZ LE MURIER AVEC DES BACTERIES ANTAGONISTES

MOSTAPHA NIKNEJAD KAZEMPOUR¹, ESMAEIL KAMRAN² & AFSANEH MERAT²

1- Department Plant Pathology, Faculty of Agricultural Sciences, Guilan University, P. O. Box 41635-1314 Rasht Iran, E-mail : nikkazem@yahoo.fr, Tel : 00981316690009, Fax : 0098 1316690281.

2- Center of Silkworm Research, Rasht – Iran.

Dans cette recherche, nous avons étudié l'effet dans des conditions *in vitro* et sous serre de certains isolats de bactéries antagonistes contre les agents responsables du pourrissement de la racine chez le mûrier en l'occurrence *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Lasiodiplodia theobromae* et *Rhizoctonia solani*, qui sont recueillis dans des muraies de la province de Guilan. Nous avons démontré la capacité antagoniste de trois cent soixante cinq isolats bactériens, séparés de la rhizosphère de mûriers infestés par les champignons ci-dessus et la capacité de 5 isolats de ces bactéries (3 gram négatives et 2 gram positives) en utilisant la méthode de culture double. Selon les résultats des tests biochimiques et morphologiques, on identifie 3 isolats : M30, M39 et M163 comme *Pseudomonas fluorescens*. Deux isolats M163 et P15 sont introduits en tant que *Bacillus cereus*. Lorsqu'on détermine les effets des métabolites volatiles produits par les bactéries antagonistes, toutes les souches inhibent la croissance de l'agent responsable du pourrissement de la racine du mûrier dans des conditions *in vitro*. Le filtrat de culture et les antibiotiques produits par ces souches inhibent la croissance des pathogènes. Tous les isolats antagonistes produisent du sidérophore sur du King B contenant 5, 15, 25 et 50 µmol de FeCl₃ qui inhibe la croissance de *Geotrichum candidum*. Le fongicide Rovral T. S. a un effet sur les souches des bactéries antagonistes quand on l'utilise à 1000 ppm. L'expérience de colonisation avec des bactéries de souches antagonistes augmente leurs populations sur le système racinaire du mûrier. Dans les conditions sous serre, on utilise des isolats antagonistes sur les plantes et par absorption dans le sol. L'analyse statistique des données indique qu'il existe des différences importantes entre les plants traités et le témoin. L'isolat est très efficace et l'incidence de la maladie par *F. solani*, *F. oxysporum*, *L. theobromae* et *Rhizoctonia solani* est de respectivement 21,5 ; 26,5 ; 25 et 29 %. Les résultats de l'utilisation d'un mélange du fongicide Rovral T. S. avec des isolats antagonistes montrent qu'il existe une incidence importante sur la maladie qui est de respectivement, 16,5 ; 21,21 et 24 %. Ces résultats suggèrent que les isolats *P. fluorescens* et *B. cereus* étudiés ont un excellent potentiel pour être utilisés comme agents de lutte biologique contre le pourrissement de la racine.

INTRODUCTION

Le mûrier, une plante ligneuse appartenant au genre *Morus alba*, de la famille des Moraceae, est largement distribué autour du globe. Le feuillage de mûrier est la seule nourriture du ver à soie (*Bombyx mori*) et est cultivé dans des conditions climatiques variées allant de tempérées à tropicales. La feuille de mûrier est un composant économique principal de la sériciculture puisque la qualité et la quantité de feuilles produites par surface unitaire a une influence directe sur la récolte de cocons (Datta, 2001). La qualité nutritionnelle du mûrier a une influence prédominante sur la croissance et

le développement des larves de *B. mori* et par la suite sur la récolte de cocons (Krishnaswami, 1978). La lutte contre les maladies est un problème majeur dans la culture du mûrier. Il est essentiel d'étudier les caractéristiques écologiques d'une maladie pour mettre au point des techniques de lutte efficaces. Cependant, aucune étude importante n'a été réalisée sur ces aspects, bien que plusieurs courts rapports aient été publiés (Hara, 1925 ; Kimura, 1979). De plus, on a récemment mis au point dans le monde entier des techniques de lutte intégrée comprenant la lutte chimique et biologique sur le plan écologique et économique pour plusieurs maladies des plantes. Néanmoins, aucune étude n'a été réalisée jusqu'à présent sur la lutte biologique contre le pourrissement de la racine en utilisant des micro-organismes antagonistes.

Dans cette étude, nous avons passé en revue les agents de lutte biologique potentiels contre les agents du pourrissement de la racine, en l'occurrence les isolats M30, M39 et M163 de *P. fluorescens* et les souches M148 et P15 de *B. cereus*, isolés sur des mûrier sains et atteints par le pourrissement de la racine.

MATERIELS ET METHODES

Isolement des pathogènes du pourrissement de la racine :

Depuis, 2002-2004, on a recueilli les échantillons dans des muraies à Rasht, Lahijan, Langeroud, Forman, Some-Sara et Parand dans la province de Guilan, en Iran, pour l'isolement de l'organisme responsable de la maladie. Les segments de racine sélectionnés sont lavés avec de l'eau courante pendant 3 heures (Yoshida et Shirata, 1999), leur surface est désinfectée par immersion dans une solution d'hypochlorure de sodium à 10 % pendant 5 minutes, ils sont rincés avec de l'eau stérilisée puis séchés sous une hotte à flux laminaire et coupés en morceaux (3 à 5 mm). On place les morceaux de tissu sur des plaques contenant de l'agar de dextrose de pomme de terre (PDA, Merck) à 2 %, avec un pH de $5,6 \pm 0,2$, amendé avec 8 mg / l de sulfate de streptomycine et 50 mg / l de chlortetracycline (Baird et coll., 1991). On transfère les plaques dans une chambre environnementale contrôlée à une température de $26 \pm 2^\circ \text{C}$. L'identification des champignons s'appuie sur la morphologie de leurs fructifications et sur leurs caractéristiques culturales (Booth, 1977 ; 1981 ; Gerlach et Nirenberg, 1982 ; Hanlin, 1991). On place les champignons poussant sur une racine pourrie sur du PDA pour les identifier en fonction des caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques. On isole souvent plus d'un champignon à partir d'un morceau unique de tissu infesté. On détermine les fréquences d'isolement d'après le nombre de morceaux de tissus infestés pour les genres et les espèces isolés. Les spores individuelles des cultures identifiées au début comme *Fusarium* spp. sont transférées sur un agar de feuille incarnat et identifiées en utilisant le système de classification de Nelson et coll., (1983). Les clés pour l'identification générale des champignons sont celles mises au point par Ellis (1971), Sutton (1980) et Barnett et Hunter (1986). On conserve les isolats sur un papier filtre à -80°C .

Tests de pathogénicité :

On infeste des grains d'orge autoclavés (300g de grains d'orge / 100 ml d'eau distillée) avec des tampons d'une culture pure de 7 à 10 jours de champignons pathogènes et on les incube pendant 3 à 4 semaines jusqu'à ce que les grains soient recouverts par le champignon. On utilise des grains d'orge stérilisés, sans champignon, comme témoin. On place des jeunes plants de mûrier (de 4 à 6 mois) dans vingt pots en plastique de $15 \times 18,5 \text{ cm}$, un plant par pot. Chaque grain d'orge infesté individuellement par un champignon pathogène et un mélange en pot commercial (1 : 10 v/v, mélange de croissance S1- substrat organique) est ajouté au pot inoculé. Pour le témoin, on place un substrat stérilisé dans dix pots. On maintient les pots à $25-28^\circ \text{C}$ avec une humidité relative saturée pendant 48 h. Après les avoir découverts, on laisse les plants dans la chambre de croissance à $26 \pm 2^\circ \text{C}$, avec un cycle par alternance de 12 hr de lumière. Quand les symptômes foliaires apparaissent, on désinfecte la surface

des segments de racines pourries d'après les descriptions précédentes et on les place sur des plaques PDA pour le réisolement du pathogène.

Isolement et identification des isolats des bactéries antagonistes:

On isole les bactéries antagonistes colonisant la rhizosphère de racines de mûrier fraîches dans différentes zones de la province de Guilan, en Iran. Après avoir vigoureusement secoué les racines coupées pour enlever tout sauf le sol qui y adhère solidement, les segments de racine (1 g) sont agités dans 100 ml d'eau distillée stérile pendant 25 min. On isole des pseudomonades fluorescentes sur du milieu B de King (KB). Selon la méthodologie de Schaad et coll., (2001), on identifie les isolats antagonistes des bactéries d'après des tests biochimiques, physiologiques et biologiques.

Efficacité des isolats de bactéries antagonistes pour inhiber les pathogènes du pourrissement de la racine *in vitro* :

Les pathogènes du pourrissement de la racine isolés sur une racine pourrie chez le cultivar de mûrier Ichinose, s'avèrent être des isolats très virulents dans un test de pathogénicité consécutif. On teste l'efficacité des isolats antagonistes pour inhiber la croissance du pourrissement de la racine en striant chaque isolat bactérien sur un côté d'une boîte de Petri contenant de l'agar de dextrose de pomme de terre et du milieu d'agar nutritif (PDA + NA). On place un disque mycéliel de 5 mm d'une culture de 5 jours de *F. moniliforme* sur du PDA + NA sur le côté opposé de la boîte de Petri. La croissance des champignons pathogènes est inhibée quant elle croît vers la colonie bactérienne et on mesure la zone d'inhibition du bord du mycélium jusqu'au bord de la colonie bactérienne. Les isolats bactériens qui inhibent les pathogènes du pourrissement de la racine sont identifiés par des tests spécifiques pour les bactéries antagonistes (Schaad et coll., 2001).

Production d'antibiotiques volatiles :

On place 250 µl de suspension bactérienne antagoniste (1×10^8 CFU / ml) dans une boîte de Petri contenant du KB, et on place un disque mycéliel d'une culture pure de quatre jours de champignons pathogènes au centre d'une autre boîte de Petri contenant du PDA. Les deux boîtes sont placées face à face pour éviter tout contact physique entre le pathogène et la suspension bactérienne et sont scellées pour isoler l'atmosphère intérieure et pour prévenir la perte des volatiles formés. On incube les plaques à 26° C pendant 6 jours et on mesure la croissance du pathogène et on la compare aux témoins s'étant développés en l'absence d'antagonistes biologiques (fausse inoculation avec un disque de PDA de 6 mm). Chaque expérience prenant en compte un isolat bactérien unique est réalisée en triple et est répétée au moins trois fois (Montealegre et coll., 2003). On exprime les résultats en tant que moyenne d'inhibition (%) de la croissance des champignons pathogènes en la présence et en l'absence de n'importe quel isolat bactérien. On calcule le pourcentage d'inhibition en utilisant la formule suivante (Montealegre et coll., 2003).

$$\% \text{ d'inhibition} = (1 - (\text{croissance fongique} / \text{croissance témoin}) \times 100$$

Production d'antibiotiques diffus :

On teste cet effet selon Montealegre et coll., (2003). On inocule les plaques de PDA, recouvertes par une membrane de Cellophane avec au centre 250 µl de suspension bactérienne bioantagoniste (1×10^8 CFU / ml). Après incubation pendant 48 hr à 26° C, on retire la membrane avec l'isolat bactérien ayant poussé et on inocule la plaque au milieu avec un disque de 5 mm d'une culture pure des plaques de champignons pathogènes qui sont plus tard incubées à 26° C pendant 7 jours et on mesure la croissance du pathogène. On réalise des témoins avec des plaques contenant du PDA faussement inoculé sur la membrane de cellophane (en remplaçant la suspension bactérienne par de l'eau distillée stérile) que l'on incube plus tard avec les agents du pourrissement de la racine. Chaque expérience prenant en compte un isolat bactérien unique est réalisée en triple et est répétée au moins trois fois.

On exprime les résultats en tant que moyenne du % d'inhibition de la croissance des champignons pathogènes en la présence et en l'absence de n'importe quel isolat bactérien antagoniste antibio.

Sécrétion extracellulaire :

On réalise ce test dans des fioles Erlenmayer de 250 ml contenant 100 ml de bouillon nutritif stérile (NB). On ajoute 1 ml des isolats de suspension bactérienne (1×10^8 CFU / ml) aux fioles contenant du NB. Puis, on incube les fioles à 26° C pendant 6 jours sur une secoueuse rotative à 100 × g à température ambiante ($26 \pm 2^\circ$ C). On culotte les cellules bactériennes par centrifugation à 5000 g pendant 12 minutes. On stérilise les surnagants avec un filtre de 0,22 µm. 5, 15 et 25 % (v/v) du filtrat de culture sont mélangés avec du PDA et on place un disque de 5 mm de quatre jours d'une culture pure de champignons pathogènes au centre du disque de la boîte de Petri. On répète les expériences indépendamment quatre fois. On exprime les résultats en tant que moyenne d'inhibition (%) de la croissance des champignons pathogènes en la présence ou en l'absence de n'importe quel isolat de filtrat de culture bactérienne.

Effet de Fe^{+3} sur le niveau d'antagonisme :

On teste cet effet selon Pumarino (1995), en utilisant $FeCl_3 \times 6H_2O$ à des concentrations de 5, 15, 25 et 50 µMol ajoutées au milieu KB. Pour tous les tests, l'unité expérimentale est la boîte de Petri.

Production de protéase :

On teste cet effet selon Maurhofer et coll., (1995). On teste l'efficacité des isolats des bactéries antagonistes dans la production de protéase en striant chaque isolat bactérien sur un milieu agar de lait écrémé (SMA) dans la boîte de Petri. Chaque expérience prenant en compte un isolat bactérien unique est réalisée en triple et est répétée trois fois. On identifie les isolats bactériens qui produisent de la protéase par une zone d'auréole entourant la colonie bactérienne que l'on mesure (Maurhofer et coll., 1995).

Effet sur les champignons pathogènes du pourrissement de la racine des isolats antagonistes *in vitro* :

On teste cet effet selon Horsfall (1956). On teste le développement des bactéries antagonistes et des champignons pathogènes avec des concentrations de Rovral T. S., de Tecto et de Benlate de 1, 3, 5, 10, 100 et 1000 ppm à température ambiante ($26 \pm 2^\circ$ C). Pour les champignons pathogènes, on place 2 ml de chacune des concentrations de fongicides mélangées avec du PDA à 50° C et un disque de 5 mm d'une culture pure de 5 jours de champignons pathogènes au centre de la boîte de Petri contenant du PDA. Après incubation pendant 7 jours à 26° C, on mesure la croissance du pathogène. On réalise des témoins avec un PDA faussement inoculé sur le milieu PDA (en remplaçant les concentrations de fongicide par de l'eau distillée stérile). Pour les isolats antagonistes, le disque de 5 mm de papier filtre Whatman no. 38, est plongé dans les concentrations de Rovral T.S. pendant 2 minutes et on le place dans la boîte de Petri contenant du KB. Après incubation pendant 48 heures à 26° C, on mesure la zone d'inhibition. On maintient quatre répétitions par concentration. Dans des conditions sous serre, on utilise une concentration des fongicides de 1000 ppm pour absorption dans le sol.

On exprime les résultats en tant que moyenne du % d'inhibition de la croissance des champignons pathogènes et de la zone d'inhibition des bactéries antagonistes. Chaque expérience prenant en compte un isolat bactérien unique est réalisée en triple exemplaire et on la répète au moins trois fois.

Capacité bactérienne de colonisation de la racine :

On détermine la capacité des bactéries à coloniser les racines d'après Misaghi (1990). On place les jeunes plants de mûrier (de 4 à 6 mois) dans des pots en plastique de 15 × 18,5 cm, un plant dans

chacun des 20 pots et on les inocule avec 450 ml de suspension bactérienne antagoniste (1×10^8 CFU / ml) contenant 1 % de gomme. On incube les pots pendant 4 mois à 26° C. Pour l'évaluation, on isole le sommet radical et on l'écrase dans du plastique contenant 5 ml d'eau distillée stérile et on dilue la suspension bactérienne obtenue. On cultive 50 µl de ces dilutions sur une boîte de Petri contenant du KB et on l'incube pendant 48 hrs à 26° C et on compte les CFU. L'unité expérimentale est de trois répétitions pour chaque isolat antagoniste. Les résultats correspondent à la moyenne de toutes les expériences.

Conditions sous serre :

Efficacité de bactéries antagonistes contre les pathogènes du pourrissement de la racine sous serre :

Pour l'évaluation sous serre, on utilise le cultivar Ichinose sensible à la maladie de la racine. On obtient des racines infestées sur des plants inoculés artificiellement avec les champignons pathogènes. On teste cinq isolats de bactéries antagonistes qui inhibent les agents du pourrissement de la racine *in vitro* pour leur efficacité à lutter contre la maladie du pourrissement de la racine sous serre. On prépare l'inoculum des champignons pathogènes avec des grains d'orge.

Préparation des inoculum bactériens :

On cultive les cellules des bactéries antagonistes utilisées dans les expériences sous serre dans du bouillon de milieu de King B (KMB) jusqu'à une dernière phase exponentielle à 27° C avec une agitation à 100 × g. On recueille les cellules par centrifugation (5000 × g / min., 10° C, 15 min.), on les lave deux fois et on les resuspend dans 0,5 % de solution NaCl stérile. On ajuste la suspension bactérienne de manière turbidimétrique à environ 1×10^8 CFU / ml pour chaque expérience. On utilise des suspensions de cellules bactériennes dans du milieu KMB pour l'absorption dans le sol.

Efficacité des traitements des plants avec des isolats de bactéries antagonistes et des fongicides :

Dans les conditions sous serre, on utilise de jeunes plants de mûrier (cv. Ichinose), puis on trempe les jeunes plants de mûrier (de 4 à 6 mois) dans les suspensions bactériennes antagonistes (1×10^8 CFU / ml) dans de la méthyl cellulose à 1 % pendant 2 heures. On ajoute séparément l'inoculum des champignons pathogènes dans le sol contenu dans les pots. Puis, on imprègne le sol des pots avec les suspensions des isolats de bactéries antagonistes et les fongicides à une concentration totale de respectivement 1×10^8 CFU / ml et 1000 ppm. On recouvre les pots avec un film en plastique et on les incube 48 hr à température ambiante, puis on place les jeunes plants de mûrier (de 4 à 6 mois) dans des pots en plastique, (un plant dans chaque pot) et on les maintient en serre à $25 \pm 2^\circ$ C et une humidité relative de 95 %. Les témoins sont inoculés avec de l'eau distillée stérile. On enregistre les symptômes de la maladie du pourrissement de la racine chez les jeunes mûriers 4 mois après la plantation. On dispose les plants selon une conception en blocs aléatoires avec cinq répétitions. On évalue l'intensité de la maladie du pourrissement 120 jours après l'inoculation des champignons pathogènes.

Analyse statistique :

On analyse l'incidence et la sévérité du pourrissement par l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant un logiciel SAS (Institut SAS, version 6,08, Cary, NC). On juge l'importance statistique au seuil de $P < 0,01$. Quand l'analyse est significative sur le plan statistique, on utilise le test multiple de Duncan (Test SSR) pour tester les séparations moyennes entre les valeurs moyennes de chaque traitement.

RESULTATS

Test de pathogénicité des champignons pathogènes sur le mûrier :

Au bout de trois mois, le jeune plant de mûrier (cv. Ichinose) présente des symptômes de pourrissement de la racine. D'après les caractéristiques des tests morphologique et de pathogénicité, on identifie les champignons suivants : *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *L. theobromae* et l'agent du pourrissement de la racine *R. solani*.

Isolement des bactéries antagonistes :

On recueille au début trois cent soixante cinq isolats bactériens dans le rhizoplan et la rhizosphère des mûriers affectés par la maladie dans les muraies des différentes zones de la province de Guilan en Iran. Parmi eux, on constate que cinq isolats inhibent la croissance des agents du pourrissement de la racine *in vitro*. On identifie trois isolats M30, M39 et M163 comme *Pseudomonas fluorescens* et deux isolats, M163 et P15 comme *Bacillus cereus* selon la méthodologie de Schaad et coll., (2001).

Efficacité de l'antibiose des isolats antagonistes pour inhiber les champignons pathogènes *in vitro* :

Culture double :

On n'observe pas de contact physique entre aucune des bactéries testées et les champignons pathogènes du pourrissement de la racine, de plus, on observe un halo inhibiteur qui suggère la présence de métabolites fongistatiques sécrétés par les bactéries. D'autre part, on observe un changement de la couleur mycéliale près de l'extrémité de la colonie de champignons pathogènes, celui-ci étant d'un marron plus foncé que celui observé au centre de la colonie. L'observation de cette zone au microscope, permet de détecter une fuite cytoplasmique que l'on peut observer jusqu'à la cloison hyphale, ce qui entraîne la déformation et l'amincissement de leur sommet jusqu'à 1/5^{ème} de sa taille originale. P15 de *B. cereus* est celui qui inhibe le plus tous les pathogènes fongiques (Tableau I).

Antibiotiques volatiles :

Tous les isolats antagonistes montrent qu'il existe une différence importante avec le témoin ($P < 0,05$). M39 de *P. fluorescens* et P15 de *B. cereus* sont les isolats des bactéries antagonistes qui présentent le meilleur effet inhibiteur sur la croissance des agents du pourrissement de la racine. Les % d'inhibition des isolats antagonistes M39 de *P. fluorescens* et P15 de *B. cereus* sont de respectivement 62 et 66 % (Tableau II).

Antibiotiques diffus :

On obtient des résultats similaires quand on teste l'effet des antibiotiques diffus. Les isolats M39 et P15 sont ceux qui inhibent le plus les champignons pathogènes du pourrissement de la racine, tandis que l'isolat M30 est l'antibiotique diffus qui inhibe le moins la croissance des champignons pathogènes (Tableau III).

Sécrétion extra cellulaire :

Il existe des différences importantes entre les isolats et la concentration des jus ($P < 0,05$). M39 de *P. fluorescens* et P15 de *B. cereus* ont un effet suppressif sur les agents du pourrissement de la racine dans des conditions *in vitro* (Tableau IV).

Production de protéase :

Tous les isolats antagonistes sont capables de produire de la protéase sur du milieu SMA. Parmi les isolats, M39 de *P. fluorescens* et P15 de *B. cereus* s'avèrent les plus efficaces et ils ont une zone de halo de 28 mm qui entoure la colonie bactérienne. Les cinq isolats sont capables de sécréter les

enzymes impliquées dans la lutte biologique et ils ont tous la capacité à lutter contre les agents du pourrissement de la racine par la sécrétion de métabolites diffus et volatiles. On peut donc conclure qu'ils utilisent ces deux derniers mécanismes de lutte par opposition à certains micro-organismes de lutte biologique qui utilisent aussi les enzymes d'hydrolyse de la paroi cellulaire (Pérez et coll., 2002).

Sidérophore :

Les cinq bactéries antagonistes présentent un comportement similaire sur la croissance de tous les pathogènes du pourrissement de la racine à n'importe quelle concentration Fe^{+3} testée.

Colonisation des racines de mûrier par les bactéries antagonistes :

Pendant les deux mois de croissance en pot, on observe des différences importantes entre les nombres de bactéries (CFU / g de racines) sur les racines de mûrier pour tous les isolats. Les comptes pour chaque isolat sont de 5,3 à 5,55 log CFU / g de racines un jour après l'inoculation et ils augmentent au bout de 2 mois au niveau de 6,5 à $7,2 \times 10^8$ CFU / g de racines. Pendant la croissance ultérieure dans du sol non stérile dans des pots sous serre, ils sont toujours au même niveau de 8,38 à 8,65 log CFU / g de racines 4 mois après l'inoculation.

Conditions sous serre :

Dans les conditions sous serre, l'analyse statistique des données sur le % d'incidence de la maladie par les agents du pourrissement de la racine indique qu'il existe des différences importantes entre les plants traités et le témoin. Parmi ces cinq isolats, M39 de *P. fluorescens* et P15 de *B. cereus* sont les plus efficaces pour lutter contre la maladie du pourrissement de la racine. L'incidence de la maladie provoquée par *R. solani* avec les isolats M39 et P15 est de respectivement 34,5 et 29 % tandis que les plants témoins présentent des incidences de la maladie de 70 % (Tableau V). Les résultats de l'utilisation du mélange des isolats (M39 et P15) montrent qu'il existe des différences importantes entre l'application du mélange d'isolats antagonistes et l'utilisation des isolats seuls. On obtient la suppression maximum quand les suspensions M39 et P15 sont ajoutées à du Rovral T. S (Tableau V).

Pendant les 120 jours de croissance en pot du jeune plant de mûrier, on observe une différence importante entre les isolats antagonistes et le témoin en ce qui concerne l'incidence de la maladie avec tous les traitements (tous les agents du pourrissement de la racine), par ailleurs, il n'y a pas de différence importante entre l'application du mélange de ces isolats et l'application de Rovral T. S. avec tous les traitements. On obtient la suppression maximum sous serre avec une incidence de la maladie de 16,5 % quand on ajoute les suspensions M39 et P15 au Rovral T. S. chez des plants de mûrier inoculés avec *F. oxysporum* (Tableau V).

DISCUSSION

Depuis quelque temps, on accorde de l'attention dans le monde entier aux bactéries antagonistes en raison de leur production de métabolites secondaires tels que les sidérophores, les composés volatiles antibiotiques HCN, les enzymes et les phytohormones. Bien que l'on ait pu obtenir les isolats de *P. fluorescens* et de *B. cereus* dans la rhizosphère de différentes muraies, il semblerait que le potentiel antagoniste de ces isolats varie beaucoup (Wilson et coll., 1992 ; Hagedron et coll., 1989). Il s'avère que les isolats de *P. fluorescens* et de *B. cereus* inhibent les agents du pourrissement de la racine avec efficacité.

Nous avons décrit ici la capacité des isolats de *P. fluorescens* et de *B. cereus* à servir d'agents de lutte biologique contre les agents du pourrissement de la racine. Les résultats des études de culture double montrent que les isolats de *P. fluorescens* et de *B. cereus* inhibent la croissance sur plaques des agents du pourrissement de la racine. Les membres du genre *Pseudomonas* spp. sont des antagonistes fongiques bien connus (Gasoni et coll., 1998). On sait qu'ils produisent des composés volatiles tels que le cyanure d'hydrogène (Castric et Castric, 1983). On a détecté la production d'HCN,

de sidérophores fluorescents et de protéases parmi les facteurs possibles impliqués dans l'activité de lutte biologique de ces souches (Bagnasco et coll., 1998 ; Bajsa et coll., 1999). On a démontré que la production d'antibiotiques est un mécanisme répandu exercé par les micro-organismes pour lutter contre une étendue variée de phytopathogènes. En particulier, on a décrit chez *Pseudomonas fluorescens*, la production de 2,4-diacetylphoroglucinol (DAPG), de Plt (pyolutéorine), de Prn (pyrrolnitrine) et de différents dérivés de phénazine (Thomashow et Weller, 1996).

Il est intéressant de constater que le choix de cinq souches natives s'est fait sur leur capacité antagoniste contre les phytopathogènes et non pas en suivant des modèles physiologiques ou génétiques. Ceci est une nouvelle contribution qui soutient le fait que la production d'antibiotiques à partir de bactéries dans le sol est un phénomène répandu. La souche CFBP 2392 de *Pseudomonas fluorescens* présente une activité antagoniste *in vitro* contre *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* et *Phytophthora parasitica*. Cependant, l'inhibition de ce dernier pathogène n'est pas associée à des effets importants sur la structure hyphale ou sur le contenu des cellules (Gianinazzi – Pearson et coll., 1999).

L'inhibition directe du pathogène et la résistance générale induite chez les plants de mûrier pourraient être toutes les deux impliquées dans la lutte (Lemanceau et Albouvette, 1993). D'après tous ces résultats, on peut conclure que l'effet de lutte biologique contre les agents du pourrissement de la racine des bactéries antagonistes isolées dans la rhizosphère de mûriers sains et malades convient à une utilisation dans des mûraies de différentes zones en Iran. La faible incidence de la maladie du pourrissement de la racine observée avec l'isolat P15 montre que les métabolites de l'antibiose sont adaptés à une inhibition rapide des agents. L'activité multiple pourrait être utile dans des conditions naturelles où la même plante peut souffrir d'autres maladies que le pourrissement de la racine de mûrier. Cette étude montre la possibilité de lutter contre le pourrissement de la racine en utilisant des bactéries antagonistes.

INVESTIGATION ON NECESSITY AND METHODS OF ESTABLISHMENT OF SERICULTURAL CO-OPERATIVES

ALIREZA SEIDAVI^{1*}, ALIREZA BIZHANNIA², MOEINNODIN MAVVAJPOUR²,
ZIAODDIN MIRHOSEINI³ & MANI GHANIPOOR²

1- PhD Student of Animal Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

2- Iran Silkworm Research Centre.

3- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Iran.

The presence of some economical problems especially in agriculture sector in Iran from one side, and considering the availability of high potential resources and possibilities for improvement of agricultural section on the other reveals the importance of deep investigations on recognising the first priority bottle necks in order to innovate new methods for improvement of different agricultural subunits e.g. sericultural industry. The most of Iranian sericultural potential and resources belong to Guilan province. Until now, the scientific investigation on necessity and methods of establishment of sericultural co-operatives in Iran has not been implemented. Therefore this research was conducted for investigation on necessity or otherwise of establishment and knowledge of co-operative types which can be employed in this field. In this regards, after designing the research aims and questions, the history of this industry at Guilan as well as considering parameters such as production, supply and demand of this industry were reviewed. The role of sericultural cooperatives at Guilan, Iran and the world and the results of other related researches were also evaluated. Finally the size of society and desired sample were determined. The data and information obtained using precise and structured observations, available documents and unstructured interviews were recorded and analysed. The obtained results demonstrated the framework and situation of Guilan sericultural industry as well as silkworm rearing methods in Guilan silkworm rearing farms. Moreover the techniques of products marketing, situation of sericultural constructions and establishments, potential of processing of fresh cocoon, mulberry field situation, distribution of silkworm egg, fresh cocoon and distribution of farmers at different regions were investigated and reported. The study also offered the discussion about the problems of sericultural industry in Guilan and considered the justifications of necessity of sericultural cooperatives establishment. In this regard, the superiority of new methods of activities (cooperation) against traditional methods (individual) was suggested. Furthermore the types of sericultural cooperative activities and their frameworks and limits of their activities as well as problems of their establishment were also discussed and proposed.

Keywords: Sericulture, cooperative, necessity, establishment method, Iran sericulture.

INTRODUCTION

Sericulture is an important industry in agricultural field and it has a background of 2650 BC (Anonymous, 1983; Anonymous, 1990; Anonymous, 1998; Wang, 1989). There are 10 million

* Corresponding Author Address: (Alireza Seidavi); House No. 180- Vali Asr St- Chamran Avenue- Rasht- Gilan- I.R. Iran. Posting code: 41857-43999. Email: alirezaseidavi@yahoo.com

silkworm rearers and 0.5 million related industrial workers in the world (Bizhannia and Seidavi, 2004a). The present capacity of silkworm eggs production in Iran is about 200000 boxes per year which are distributed between 80 000 silkworm house holders (Seidavi, 2000). Annual cocoon production in Iran reaches to about 6 000 metric tons which is very negligible in comparison with last centuries. Available information, reports and documents shows that many problems threaten this industry. Sericultural industry has a suitable potential for development and establishment of sericultural cooperatives. Then it is necessary to investigate the possibility of sericultural co-operative organisation in Iran. If this research shows that the formation of cooperatives will reduce the Iranian sericultural industry problems, promote the development of this industry, increase the job chances in rural areas and etc, it would be necessary to monitor the procedures of their establishment. Meanwhile methods of sericultural cooperatives establishment must be investigated. This study planned to answer these questions. There is no scientific and plenary investigation about sericultural co-operative organisations, the roles and their qualities in Iran as of now. The present references only pointed to positive effects of co-operative performance without any recommendation on their manner of organising and establishment. But sericultural cooperatives organisation at sericultural development countries has a history of more than half a century, however there were not any foreign available resources about necessity and methods of sericultural cooperatives (Anonymous, 1967; Khomamizadeh, 1994; Seidavi, 2000; Bizhannia and Seidavi, 2004b). Rajasekharan (1992) and Anonymous (1996) studied about rural poverty alleviation on the basis of AIRD organisation experiences (Asian Institute for Rural Development). Their results showed that for expanding sericulture in suitable zones and poverty alleviation, establishment of rural sericultural cooperative organisations is an appropriate method. They have pointed that AIRD organisation has implemented sericultural developing designs for improvement of human sources and technology export, using co-operative performance process. Anonymous (1993; 1995) and Kerutagi *et al.* (1994) studied problems of sericulture enterprises in Bijapour district. They proposed that sericultural co-operative organisations under government support can be an appropriate strategy for development of sericulture.

Rajagopalan (1996) has conducted a research about agricultural cooperation. He studied principles and frameworks of co-operative organisation and investigated the establishment mechanisms of sericultural cooperation in Indian villages. This study indicated that co-operative organizations had positive role in rural development especially in sericulture section. Kottary (1993) showed that accomplishment of a program by United Nation (UNDP) for sericultural cooperatives establishment had positive results and responses. In this program, rural women planted mulberry trees in a part of their farms which was not used for other agricultural activities. The mulberry leaves were used for silkworm rearing and harvested cocoons converted to silk yarn by means of domestic cottage basins and sold to other zones. Then the benefit obtained was shared between them which increased the income of rural women remarkably (Seraie, 1993). Many researches were conducted by Manjeet (1986); Lu (1991); Wu and Chen (1992); Giriappa (1993) and Ho (1996) relating to principles of sericulture, rural development and strategies for developing and poverty alleviation in those zones. They investigated on multiple ways for rural developing by studying their different aspects and problems. They believed that sericultural activities with rural co-operative format can change the level of livelihood positively. Krishnaswami *et al.* (1973); Manjeet (1987); Zhang *et al.* (1988) and Lizuka (1990) performed a comparative study on the efficiency of different silkworm rearing methods. They collated silkworm rearing between two systems including co-operative organizations (modern approach) and traditional system (primitive method) and concluded that former method has more benefit with lower expenditure.

Therefore it can be concluded that more researchers have emphasised on establishment of sericultural co-operative organizations. While quality of these organizations establishment method are variable in different countries. It is clear and demonstrable that co-operative organizations are efficient and irrefutable in rural development.

MATERIALS AND METHODS

In this experiment, studied variables were measured in Guilan province with the main share of Iran sericultural activities i.e. 66.3% of farmers and 87% mulberry fields in whole country. Meanwhile 66.9% cocoon yields are produced by Guilan farmers. In order to select the sample for investigation on necessity and methods of sericultural cooperatives establishment, attention must be paid to different subjects and parameters considering the research aims focused on them. Other factors such as statistical population size, impressible value of research dependent variables from independent variables, results feasibility value, heterogeneity of studied variables and validity and reliability of measuring instruments were also noticed and observed. Therefore dispersion of statistical population individuals within statistical population was studied carefully. Due to the large size of statistical population in this study which covered all sericultural activities in Guilan province, it was impossible to access all members. Therefore a selected cluster using random sampling was used. The selected cluster of study was Langroud city with one third of Guilan having sericultural activities. Simple random sampling was employed inside this cluster. On the base of cluster, random sampling method and in order to improve the validity of the obtained results and their generalisation ability to higher levels, random samples in studied cluster were selected from different villages of three zones at Langroud (Central Area, Koomleh and Otaghvar). One hundred farmer families from ten villages of Langroud were selected. Estimated number of samples reached to 100 farmers. In this study according to design structure and its parameters, the following methods were implemented for data collection:

Precise or structured observations:

All necessary data were collected by personal interview of research executors at study sites and complete monitoring of events was done. Since in the most cases informed persons were not able to exchange their information and in order to avoid any possible errors, this method was employed.

Review of available documents, papers and reports and use of statistics and library references:

These references were used in order to investigate the related information in order to study population and subjects. This approach created some valuable information which is documented for studying objects.

Free interview:

In order to complete the field obtained results, some authorities and informed persons were subjected for free interviews. The collected data in this way did not basically affect the results of study; however they helped to clear some aspects of research parameters and to ensure the authors from the accuracy of results.

RESULTS AND DISCUSSION

I. Sericultural Infrastructure:

It was found that sericultural structure in studied villages of Guilan province consists of individual farmers. They also try to provide them the necessary silkworm eggs individually from government selling centres and mostly hatch the eggs by themselves without using cooperation activities or governmental sectors' aid. However some promotion training services have been provided by government sector where the farmers participated to these workshops individually. The same structure was observed for rearing of newly hatched and late age larvae without the presence of any co-operative or governmental sectors. This study showed that grown silkworm rearing, mounting, cocoon harvesting, handling and selling have been done individually. The farmers sell their fresh cocoon to private or government sectors according to the market condition. In order to produce seed cocoon for

commercial silkworm egg production some specialised farmers are selected to rear parent silkworm lines who offer their cocoons only to governmental sector on a consenting price according to the cocoon quality. All related activities to mulberry fields including plantation, propagation, cultivation, and harvesting used to be carried out individually without any notable effect of co-operative organizations. However some supporting materials such as fertiliser, medicine, mulberry saplings etc. were provided by government sectors but these activities were also done individually. We understood that silkworm races rearing for seed cocoon production (except those related to selected seed cocoon farmers) and silkworm eggs production are totally monopolised by governmental sector. Of course in Guilan province a limited part of commercial silkworm eggs production was given to a co-operative section but under control of government during last two years (1999-2000) and produced eggs were delivered to government sector. Therefore and in order to avoid of unreal results, we supposed that all of these process were under governmental control even though there is a suitable view for development of this co-operative. Mulberry and silkworm breeding activities and introduction of new varieties were done by government sector only and private or co-operative sections have no presence in this task.

II. The problems of sericultural activities:

On the base of the results of this study, the main bottlenecks of sericultural activities in Guilan province can be summarised as follow:

- silkworm egg production
- silkworm egg hatching
- silkworm rearing
- mulberry field
- sericultural buildings and foundations
- cocoon marketing

III. The necessity of sericultural co-operative establishment:

The investigation of the Guilan province sericulture and its problems indicated that for the best exploitation of domestic foundations and possibilities, the formation of sericultural cooperatives is of high and critical importance. Regarding the role of co-operative organisation on regional development of existing facilities, reduction of present difficulties as well as the merits of progressed methods compare to traditional one, the necessity of co-operative organizations can be cleared.

1. The role of co-operative organizations in problems solving:

According to the obtained results, some parts of farmers' problems in Guilan would be solved via the establishment of efficient co-operative organizations which emphasise the necessity of sericultural co-operative approach.

Therefore the role of co-operative organizations for these purposes can be chased for all related subjects such as silkworm egg production/hatching, silkworm rearing, mulberry field, sericultural rearing places and marketing.

2. The advantages of modern methods compared to traditional methods:

The merits of employment of progressive methods in sericultural activities by means of co-operative organizations could be demonstrated from the obtained results of this study which makes this system more efficient and beneficial than old sericultural methods in Guilan. Some advantages of modern methods based on joint actions compare to traditional methods that emphasise on individually activities are as follow:

- decreasing of expenditure and increasing of efficiency
- using of trade union supports
- proper planning and decision making

- possibility of members support
- possibility of using of modern equipment and experts services
- reducing of farmers working time with production growth
- exploitation of added value and side opportunities
- minimising the existing difficulties with providing the basis of regional development

3. Establishment of developmental outlines:

The interference of co-operative organizations in sericultural activities will accelerate the utilisation of the potential possibilities in Guilan province which in turn increase the rate of development and production efficiency. This may lead to promotion of related industries, elevation of social welfare, providing of new jobs opportunities and so on.

4. Kinds of sericultural cooperatives activities:

The pronounced discussions demonstrated the positive and important role of co-operative organizations in sericultural activities. In other words we can say that all of the sericultural problems could be able to dissolve in Iran via organisation of cooperatives. In this regard the essential activities of Guilan sericultural cooperatives can be summarised as follow:

- production and hatching of silkworm egg and young silkworm rearing
- production of cocoon
- propagation and production of mulberry sapling
- others sericultural and dependent industries activities

5. Infrastructure of sericultural co-operative organizations:

In attention to the mooted discussion in this research, it is distinguished that all of the sericultural co-operative organizations can be divided into two major types. Some co-operations are conducted for providing of necessary materials and facilities for farmers, while the other types of co-operations work as a group of farmers themselves. Indeed considering the organising type of cooperatives, one of the above mentioned structures would be formed.

- Producers' requirements providing co-operative co.:

One of the objects of sericultural co-operative organizations is to meet the requirements of producers. In these kinds of organizations, the members continue or strengthen their works by means of existing possibilities and facilities of the co-operative co. Therefore the members can approach some supports through the cooperatives which may not be available for the individual farmers. The members depending upon cooperatives facilities can increase their yielding level and efficiency and may realise more income. Furthermore the members would be provided more protection and supports against the events and problems. In this case farmers will receive governmental supports clearly and legally.

- Sericultural productive co-operative co.:

The members of this kind of sericultural co-operative co. enjoy the facilities, materials and possibilities of the co-operative directly for production. Generally the members had no previous experiences for the job individually and intend to try in this task by establishing a co-operative organisation in order to obtain the advantages of common investment, co-working and governmental supports.

6. The area and activities of sericultural cooperatives organizations activities consist of:

- providing of silkworm egg
- hatching of silkworm egg
- silkworm rearing and production and propagation of mulberry sapling

- mulberry field management technology
- using of suitable buildings and foundations
- presentation of yields and quality analysing
- education of farmers on proper methods of management and new science
- buying of individual farmers' cocoons
- performing of all related activities as services providing e.g. cocoon processing, reeling, weaving etc.
- supporting of members against disease incidence, natural misadventures etc.
- participation in higher level planning and absorption of governmental supports e.g. appropriate codification for sericultural improvement
- productive activities in various fields e.g. horticulture, husbandry etc using sericultural and building and equipment

7. The problems for establishment of the sericultural cooperative organizations:

There are many problems and difficulties for the sericultural cooperative organizations establishment and continuation of their activities. Some of the main problems include:

- limitation for whole year round production
- economical bottlenecks
- socio-cultural problems
- bureaucracy
- and others

Complementary researches and studies must be done for establishment of productive cooperatives in order to accelerate the progressive development in sericultural field. In this way the related industries such as silk reeling, silk weaving and etc. may find their role in rural families beside the other agricultural activities such as poultry industry, sheep husbandry and etc.

REFERENCES

- ANONYMOUS. (1967). Sericulture, the Japan silk Association, 129p.
- ANONYMOUS. (1986). Result and Scopes in silkworm breeding, Sericulture Experiment Station Rural Development Administration Suwon, The Republic of Korea, 53p.
- ANONYMOUS. (1990). Handbook of Pest and disease control of mulberry and silkworm, Economic and social Commission for Asia and Pacific, 88p.
- ANONYMOUS. (1993). Principles and techniques of Silkworm breeding, Economic and Social Commission for Asia and Pacific, 114p.
- ANONYMOUS. (1995). Sericulture in tropics, Association for International Cooperation of Agriculture and forestry, Japan, 150p.
- ANONYMOUS. (1996). Country report on sericulture, National sericulture and Entomology Research Institute Rural Development Administration, Korea International Cooperation Agency, 157p.
- ANONYMOUS. (1998). The Practices of egg Production, Silkworm rearing and disease control. Department of Sericulture and Entomology, Nasti, India, 82p.
- BIZHANNIA A.R. & SEIDAVI A.R. (2004a). Iran Sericultural. Sonboleh Journal. Vol 139. pp: 26-30.
- BIZHANNIA A.R. & SEIDAVI A.R. (2004b). Sericultural history and its current situation. Sonboleh Journal. Vol136. pp: 38-41.
- GIRIAPPA S. (1993). Rural development in action. Daya publishing House Dehli, India, 217p.
- HO Z.L. (1996). Basic Principles and practical techniques of silkworm breeding, 119p.
- KERUTAGI M.G., MURTHY H.G.S. & PATIL G.M. (1994). Problems of sericulture enterprises in Bijapour district (Ab). National Bank News Review Bombay, 10 (3): 65-68.

- KHOMAMIZADEH I. (1994). Sericulture industry in Iran. Cultural research institute press. Tehran press. P252.
- KOTTARY G. (1993). The silk route to development (Ab). Choices the Human Development Magazine (Ab), 2(4): 13-17.
- KRISHNASWAMI S., NARASIMHANNA M.N., SURYANARAYAN S.K. & KUMARAJ S. (1973). Manual on sericulture (Vol 2: Silkworm rearing), 131p.
- LIZUKA H. (1990). Development Process and reorganization Policies of cooperative rearing of young silkworms (Ab). Bulletin of the national Agriculture Research center. No.19: 39-59.
- LU Y.L. (1991). Silkworm disease, 75p.
- MANJEET S.J. (1986). Economics of sericulture under irrigated Conditions. Central Sericultural Research and Training Institute, 19p.
- MANJEET S.J. (1987). Appropriate Sericulture Techniques. 176p.
- RAJAGOPALAN R. (1996). Rediscovering co-operation (Ab). Institute for Rural Management Anand, India.
- RAJASEKHARAN M. V. (1992). Activities for poverty Alleviation (Ab). Partners in rural poverty alleviation: NGO - cooperation. 99-107.
- SARAEI H. (1993). Sampling at research. Semat press. Tehran.
- SEIDAVI A.R. (2000). Sericultural co-operatives in Guilan. Final research report. Co-operative ministry of Islamic Republic of Iran. 155p.
- SHOH D.R. (1990). Alternatives in rural development (Ab). Sterling publishing. New Delhi, India, 414 p.
- WANG S.M. (1989). Silkworm eggs Production, FAO, 64 p.
- WU P.C & CHEN D.C. (1992). Silkworm rearing. FAO. 83 p.
- ZHENG T.Z., TAN T.F., HUNG G.X., FANAND H. & MEN B. (1988). Mulberry cultivation, FAO, 127 p.

ETUDE SUR LE BESOIN ET SUR LES METHODES DE CREATION DE CO-OPERATIVES SERICICOLES

ALIREZA SEIDAVI^{1*}, ALIREZA BIZHANNIA², MOEINNODIN MAVVAJPOUR²,
ZIAODDIN MIRHOSEINI³ & MANI GHANIPPOOR²

1. PhD Student of Animal Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch,
Tehran, Iran.

2. Iran Silkworm Research Centre.

3. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Iran.

La présence, d'un côté, de certains problèmes économiques en Iran surtout dans le secteur agricole et de l'autre, la présence de ressources potentielles et de possibilités importantes d'amélioration du secteur agricole, montre l'importance d'études approfondies sur la reconnaissance des principaux goulots d'étranglement de manière à mettre au point de nouvelles méthodes pour l'amélioration des différents secteurs agricoles, par exemple de l'industrie séricicole. La plupart du potentiel et des ressources séricicoles en Iran se situent dans la province de Guilan. Jusqu'à présent en Iran on n'a pas donné suite aux études scientifiques sur le besoin et sur les méthodes de création de coopératives séricicoles. Nous avons donc réalisé cette recherche pour étudier quel est le besoin en coopératives, la manière dont elles se sont établies et connaître les types que l'on peut utiliser dans ce secteur. A cet égard, après avoir défini les buts et les domaines de cette recherche, nous avons passé en revue l'histoire de cette industrie à Guilan et nous avons pris en considération les paramètres tels que la production, l'offre et la demande de cette industrie. Nous avons aussi évalué le rôle des coopératives séricicoles à Guilan, en Iran, et dans le monde entier et les résultats d'autres études à ce sujet. Finalement, nous avons déterminé la taille de la société et de l'échantillon désiré. Nous avons enregistré et analysé les données et les informations obtenues en utilisant des observations précises et structurées, les documents disponibles et des entretiens informels. Les résultats obtenus montrent l'environnement et la situation de l'industrie séricicole à Guilan ainsi que les méthodes d'élevage du ver à soie dans les magnaneries de Guilan. De plus, nous avons étudié les techniques de vente des produits, la situation des constructions et des établissements séricicoles, le potentiel de transformation des cocons frais, la situation des muraies, la distribution des œufs de vers à soie, des cocons frais et la distribution des fermiers dans les différentes régions. L'étude propose aussi une discussion sur les problèmes de l'industrie séricicole à Guilan et explique pourquoi il serait nécessaire de créer des coopératives séricicoles. A cet égard, nous notons la supériorité des nouvelles méthodes d'activités (coopération) sur les méthodes traditionnelles (individuelles). De plus, nous discutons et faisons des propositions sur les types d'activités des coopératives séricicoles et sur le cadre et les limites de leurs activités ainsi que sur les problèmes que l'on peut rencontrer à leur création.

INTRODUCTION

La sériciculture est une industrie importante dans le domaine agricole et elle remonte à 2650 avant J. C. (Anonyme, 1983 ; Anonyme, 1990 ; Anonyme, 1998 ; Wang, 1989). Il y a 10 millions d'éleveurs

* Auteur auquel adresser la correspondance : (Alireza Seidavi) : House no. 180 – Vali Asr St – Chamran Avenue – Rasht – Gilan – I. R. Iran. Code postal : 41857 – 43999. Email : alirezaseidavi@yahoo.com.

de vers à soie et 0,5 millions d'ouvriers travaillant dans des industries associées dans le monde entier (Bizhannia et Seidavi, 2004a). La capacité actuelle de production d'œufs de ver à soie en Iran est d'environ 200 000 boîtes par an, qui sont distribuées entre 80 000 foyers (Seidavi, 2000). La production annuelle de cocons en Iran atteint environ 6000 tonnes, ce qui est très négligeable par comparaison aux siècles précédents. L'information disponible, les rapports et les documents montrent que de nombreux problèmes menacent cette industrie. L'industrie séricicole dispose d'un potentiel approprié pour la mise au point et la création de coopératives séricicoles. Il est donc nécessaire d'étudier la possibilité d'organiser des coopératives séricicoles en Iran. Si cette recherche montre que la formation de coopératives diminuerait les problèmes de l'industrie séricicole iranienne, promouvoir le développement de cette industrie, augmenterait les possibilités d'emploi dans les zones rurales, etc., il serait nécessaire de contrôler les procédures de leur création. Entre-temps, il faut étudier les méthodes de création de coopératives séricicoles. Le but de cette étude est de répondre à ces questions. Il n'y a pas eu d'étude scientifique et complète sur les organisations de coopératives séricicoles, leurs rôles et leurs qualités en Iran jusqu'à présent. Les références actuelles montrent seulement les effets positifs des performances des coopératives sans aucune recommandation sur leur type d'organisation et de création. Mais l'organisation de coopératives séricicoles dans les pays où la sériciculture est développée remonte à plus d'un demi-siècle, cependant il n'y pas de ressources étrangères disponibles sur le besoin en coopératives séricicoles et sur leurs méthodes (Anonyme, 1967 ; Khomamizadeh, 1994 ; Seidavi, 2000 ; Bizhannia et Seidavi, 2004b). Rajasekharan (1992) et Anonyme (1996) ont fait des études sur l'allègement de la pauvreté rurale à partir d'expériences réalisées par l'organisation AIRD (Asian Institute for Rural Development). Leurs résultats montrent que pour l'expansion de la sériciculture dans les zones adaptées et l'allègement de la pauvreté, la création d'organisations coopératives séricicoles rurales est une méthode appropriée. L'organisation AIRD a mis en place des projets de développement de la sériciculture pour l'amélioration des ressources humaines et de l'exportation des technologies, en utilisant le processus de performance des coopératives. Anonyme (1993 ; 1995) et Kerutagi et coll., (1994) ont étudié les problèmes des entreprises séricicoles dans la région de Bijapur. Ils ont suggéré que des organisations de coopératives séricicoles avec le soutien du gouvernement pourraient être une stratégie appropriée pour le développement de la sériciculture.

Rajagopalan (1996) a réalisé une recherche sur la coopération agricole. Il a étudié les principes et les cadres des organisations coopératives et les mécanismes d'une coopération séricicole dans les villages indiens. Cette étude montre que les organisations coopératives ont un rôle positif dans le développement rural surtout dans le secteur de la sériciculture. Kottary (1993) a montré que l'accomplissement d'un programme par les Nations Unies (PNUD) pour la création de coopératives séricicoles a entraîné des résultats et des réponses positifs. Dans ce programme, les femmes de milieu rural ont planté des mûriers dans une partie de leurs fermes non utilisée par d'autres activités agricoles. Les feuilles de mûrier sont utilisées pour l'élevage des vers à soie et les cocons récoltés sont convertis en fil de soie au moyen de bassines domestiques artisanales et vendues à d'autres zones. Puis les bénéfices obtenus sont partagés entre elles, ce qui augmente les revenus des femmes dans les zones rurales de manière remarquable (Seraie, 1993). Manjeet (1986) ; Lu (1991) ; Wu et Chen (1992) ; Giriappa (1993) et Ho (1996) ont réalisé de nombreuses recherches à propos des principes de la sériciculture, du développement rural et des stratégies pour le développement et l'allègement de la pauvreté dans ces zones. Ils ont étudié les divers types de développement rural sous leurs différents aspects et problèmes. Ils pensent que les activités séricicoles dans le cadre de coopératives rurales peuvent changer le niveau de vie de manière positive. Krishnaswami et coll. (1973) ; Manjeet (1987) ; Zhang et coll., (1988) et Lizuka (1990) ont réalisé une étude comparative sur l'efficacité de différentes méthodes d'élevage des vers à soie. Ils ont comparé l'élevage de vers à soie avec deux systèmes dont l'organisation avec des coopératives séricicoles (approche moderne) et le système traditionnel (méthode primitive) et en ont conclu que la première méthode entraîne plus de bénéfices et moins de dépenses.

On peut donc conclure que la plupart des chercheurs accordent une importance particulière à la création d'organisations coopératives séricicoles. Tandis que la qualité de la méthode de création de ces organisations varie selon les pays. Il est clair et démontrable que les organisations coopératives sont efficaces et indispensables pour le développement rural.

MATERIELS ET METHODES

Dans cette expérience, on mesure les variables étudiées dans la province de Guilan où a lieu la plus grande part des activités séricicoles en Iran soit 66,3 % des fermiers et 87 % des muraies du pays. Les fermiers de Guilan produisent 66,9 % des cocons. Pour sélectionner l'échantillon de l'étude sur le besoin et sur les méthodes de création de coopératives séricicoles, il faut accorder de l'attention à différents sujets et paramètres tout en tenant compte des buts de l'étude. D'autres facteurs sont pris en compte tels que la taille de la population statistique, la valeur sensible dans la recherche des variables dépendantes des variables indépendantes, la faisabilité des résultats, l'hétérogénéité des valeurs étudiées et la validité et la fiabilité des instruments de mesure. Nous avons étudié avec attention la dispersion des individus de la population statistique à l'intérieur de la population. Compte tenu de la grande taille de la population statistique dans cette étude qui couvre toutes les activités séricicoles de la province de Guilan, il est impossible d'accéder à tous les membres. Nous avons donc utilisé un groupe sélectionné en utilisant l'échantillonnage aléatoire. Le groupe sélectionné étudié est la ville de Langroud, un tiers de Guilan ayant des activités séricicoles. On utilise un échantillonnage aléatoire simple dans ce groupe. On sélectionne la méthode d'échantillonnage aléatoire sur la base du groupe et des échantillons aléatoires dans le groupe étudié de différents villages de trois zones à Langroud, (Centre, Koomleh, et Otaghvar) pour améliorer la validité des résultats obtenus et leur capacité de généralisation à des niveaux plus élevés. On sélectionne cent familles de fermiers provenant de dix villages de Langroud. Compte tenu de la structure du projet et de ses paramètres, on applique les méthodes suivantes pour le recueil des données :

Observations précises ou structurées :

Toutes les données nécessaires sont recueillies par entretien personnel des personnes impliquées dans la recherche dans les lieux étudiés et tous les événements sont contrôlés. On emploie cette méthode puisque dans la plupart des cas, les personnes informées ne sont pas capables d'échanger leurs informations et pour éviter toute erreur possible.

Passage en revue des documents disponibles, papiers et rapports et utilisation des statistiques et des références des bibliothèques :

On utilise ces références pour étudier l'information parallèle de manière à connaître la population et les sujets. Cette approche crée une information de valeur à partir de documents sur les sujets étudiés.

Entretien libre :

Pour compléter les résultats obtenus sur le terrain, certaines autorités et personnes informées sont soumises à des entretiens libres. Les données recueillies de cette manière n'ont pas en gros d'effet sur les résultats de l'étude ; cependant, elles aident à clarifier certains aspects des paramètres de la recherche et à assurer les auteurs de l'exactitude des résultats.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Infrastructure séricicole :

Il s'avère que la structure de la sériciculture des villages étudiés dans la province de Guilan s'articule autour de fermiers individuels. Ils se procurent les œufs de vers à soie nécessaires de manière individuelle auprès des centres de vente gouvernementaux et la plupart font éclore les œufs par

eux-mêmes sans utiliser d'activités de coopération ou l'aide des secteurs gouvernementaux. Cependant, le secteur gouvernemental apporte certains services de promotion et de formation aux fermiers sous la forme d'ateliers auxquels ils participent de manière individuelle. On observe la même structure pour l'élevage des larves venant d'éclore et des larves du dernier âge sans la présence d'aucun secteur coopératif ou gouvernemental. Cette étude montre que l'élevage, la montée des vers adultes, la récolte, la manipulation et la vente des cocons se fait de manière individuelle. Les fermiers vendent leurs cocons frais aux secteurs privés ou gouvernementaux selon les conditions du marché. Pour fournir les cocons de grainage pour la production commerciale d'œufs de vers à soie, certains fermiers spécialisés sont sélectionnés pour élever les lignées de vers à soie parentaux et ils n'offrent leurs cocons qu'au secteur gouvernemental à un prix agréé selon la qualité des cocons. Toutes les activités liées aux muraies dont la plantation, la multiplication, la culture et la récolte sont habituellement réalisées de manière individuelle sans aucun effet notable d'organisations coopératives. Cependant, le secteur gouvernemental apporte certains matériaux de support tels que les engrais, les remèdes, les jeunes plants de mûrier etc. mais ces activités se font aussi de manière individuelle. Nous avons compris que l'élevage des races de vers à soie pour la production de cocons de grainage (à l'exception de celles liées aux fermiers sélectionnés produisant les cocons de grainage) et la production d'œufs de vers à soie sont totalement monopolisées par le secteur gouvernemental. Bien sur, dans la province de Guilan, une section coopérative s'est occupée d'une partie limitée de la production commerciale d'œufs de vers à soie mais sous le contrôle du gouvernement pendant les deux dernières années (1999-2000) et les œufs produits sont livrés au secteur gouvernemental. Pour éviter tout résultat irréel, nous avons donc supposé que tous ces processus ont lieu sous le contrôle gouvernemental même si l'opinion au développement de cette coopérative est favorable. Les activités de lignage du mûrier et du ver à soie et l'introduction de nouvelles variétés ne sont réalisées que par le secteur gouvernemental et les secteurs privé ou coopératif ne sont pas impliqués dans cette tâche.

II. Les problèmes des activités séricicoles :

Sur la base des résultats de cette étude, on peut résumer les principaux goulets d'étranglement des activités séricicoles dans la province de Guilan comme suit :

- production des œufs de vers à soie
- éclosion des œufs de vers à soie
- élevage des vers à soie
- muraies
- bâtiments et institutions séricicoles
- vente des cocons

III. Nécessité de la création de coopératives séricicoles :

L'étude de la sériciculture dans la province de Guilan et de ses problèmes montre que pour la meilleure exploitation des institutions et des possibilités domestiques, la formation de coopératives séricicoles est d'une importance primordiale et critique. En ce qui concerne le rôle des organisations coopératives dans le développement régional des infrastructures existantes, nous expliquons comment les organisations coopératives pourraient diminuer les difficultés actuelles et nous présentons les mérites des méthodes progressistes par comparaison à la méthode traditionnelle.

1. Le rôle des organisations coopératives pour résoudre les problèmes :

Selon les résultats obtenus, certains des problèmes des fermiers à Guilan pourraient être résolus par la création d'organisations coopératives efficaces qui témoignent de la nécessité d'une approche coopérative de la sériciculture.

Dans cette optique, on peut donc chercher comment les organisations coopératives peuvent avoir un rôle dans tous les domaines parallèles tels que la production / l'éclosion d'œufs de vers à soie, l'élevage de vers à soie, les muraies, les lieux d'élevage séricicole et la vente.

2. Avantages des méthodes modernes par rapport aux méthodes traditionnelles :

Les résultats obtenus dans cette étude montrent les mérites de l'emploi de méthodes progressistes dans les activités séricicoles grâce à l'organisation de coopératives qui sont un système plus efficace et plus bénéfique que les anciennes méthodes séricicoles à Guilan. D'après des actions regroupées, certains avantages des méthodes modernes par comparaison aux méthodes traditionnelles qui mettent l'accent sur des activités individuelles sont les suivants :

- baisse des dépenses et augmentation de l'efficacité
- utilisation du soutien des syndicats
- planification et prise de décision correctes
- possibilité du soutien des membres
- possibilité de l'utilisation d'un équipement moderne et de services experts
- réduction du temps de travail des fermiers avec croissance de la production
- exploitation de la valeur ajoutée et d'opportunités parallèles
- minimisation des difficultés existantes avec l'apport d'une base au développement régional

3. Etablissement des grandes lignes du développement :

L'interférence d'organisations coopératives dans les activités séricicoles permettrait d'accélérer l'utilisation du potentiel de la province de Guilan, ce qui à son tour augmenterait le taux de développement et l'efficacité de production. Cela pourrait amener à la promotion des industries associées, à l'élévation du bien-être social et à l'apport de nouveaux débouchés et ainsi de suite.

4. Types d'activités des coopératives séricicoles :

Les discussions entendues prouvent le rôle positif et l'importance de l'organisation de coopératives séricicoles dans les activités de sériciculture. En d'autres termes, on peut dire que tous les problèmes séricicoles pourraient disparaître en Iran par l'organisation de coopératives séricicoles. A cet égard, on peut résumer les activités essentielles des coopératives séricicoles à Guilan comme suit :

- production et éclosion des œufs de vers à soie et élevage des jeunes vers
- production de cocons
- multiplication et production de jeunes mûriers
- autres activités de sériciculture et des industries dépendantes

5. Infrastructure des organisations coopératives séricicoles :

Au vue des discussions entreprises dans cette recherche, on peut diviser les organisations coopératives séricicoles en deux types principaux. Certaines coopérations apportent les matériaux et les infrastructures nécessaires aux fermiers tandis que les autres types de coopérations sont un groupe de fermiers qui travaillent ensemble. Compte tenu du type d'organisation des coopératives, c'est donc l'une des structures mentionnées ci-dessus qui se formerait.

- Coopératives répondant aux besoins des producteurs:

L'un des buts des organisations coopératives séricicoles est de répondre aux besoins des producteurs. Dans ces types d'organisations, les membres peuvent continuer ou renforcer leur travail au moyen des possibilités et des infrastructures de la coopérative. Les coopératives offrent un soutien aux membres qui pourrait ne pas être disponible pour les fermiers sur une base individuelle. Grâce aux infrastructures des coopératives les membres peuvent augmenter leur niveau de rendement et leur

efficacité et peuvent augmenter leurs revenus. De plus, les membres disposent de plus de protection et de soutien contre les aléas et les problèmes. Dans ce cas, les fermiers reçoivent un soutien gouvernemental de manière claire et légale.

Coopératives de production séricicole :

Les membres de ce type de coopérative séricicole disposent d'infrastructures, de matériaux et des possibilités de la coopérative directement pour la production. En général, les membres n'ont pas d'expérience précédente dans le travail et ont l'intention d'essayer cette activité en créant une organisation coopérative afin de bénéficier des avantages d'un investissement commun, du fait de travailler ensemble et du soutien gouvernemental.

6. Le domaine et les activités des organisations coopératives sont les suivants :

- l'apport des œufs de vers à soie
- l'éclosion des œufs de vers à soie
- l'élevage des vers à soie et la production et la multiplication des jeunes mûriers
- la technologie de gestion des muraies
- l'utilisation de bâtiments et d'institutions adaptés
- la présentation des rendements et l'analyse de la qualité
- l'éducation des fermiers sur les méthodes correctes de gestion et sur les nouvelles technologies
- l'achat des cocons des fermiers individuels
- la réalisation de toutes les activités associées en offrant des services tels que la transformation, le dévidage, le filage des cocons
- le soutien des membres contre l'incidence des maladies, les catastrophes naturelles
- la participation à un niveau de planification plus élevé et le bénéfice des soutiens gouvernementaux, par exemple codification appropriée pour l'amélioration de la sériciculture
- des activités productives dans différents domaines, par exemple l'horticulture, l'élevage en utilisant les bâtiments et les équipements séricicoles

7. Problèmes concernant la création d'organisations séricicoles coopératives :

Il existe de nombreux problèmes et difficultés pour la création d'organisations coopératives séricicoles et pour la continuation de leurs activités. Certains des principaux problèmes sont les suivants.

- difficulté à produire pendant toute l'année
- goulets d'étranglement économiques
- problèmes socioculturels
- bureaucratie
- et autres

Il faut réaliser des études et des recherches complémentaires sur la création de coopératives productives de manière à accélérer l'amélioration du développement dans le domaine séricicole. De cette manière, les industries parallèles telles que le dévidage de la soie, le tissage de la soie, etc.. pourraient trouver leur rôle chez les familles du secteur rural à côté d'autres activités agricoles telles que l'industrie des volailles, l'élevage des moutons, etc..

GRAINAGE PARAMETERS OF COMMERCIAL SILKWORM HYBRIDS AS INFLUENCED BY VARIOUS LEVELS OF NITROGEN SUPPLIED THROUGH DIFFERENT ORGANIC SOURCES

A. RAVIKUMAR, T. K. NARAYANASWAMY, M. A. SHANKAR, B. SANNAPPA & D. CHANDRAPPA

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, Bangalore-560065, India

Seed technologies are important in sericulture, since a good seed leads to productive cocoon crop. Thus, a study was under taken to know the effect of application of nitrogen, at different levels through varied sources supplied to mulberry, on grainage parameters. Among nitrogen sources, the use of farmyard manure (FYM), green leaf manure (GLM) (Glyricidia) and castor cake (CC) at 75, 50 and 25 per cent levels. Further, the application of 50 % N through GLM + 50 % N through urea and 50 % N through CC + 50 % N through urea showed better performance with regard to pupal weight, pupal duration, moth emergence, fecundity and hatchability. Among hybrids, CSR₂ × CSR₄ topped by first recording higher grainage parameters as compared to rainy and summer seasons.

Keywords: Grainage, nitrogen, organic, silkworm.

INTRODUCTION

Mulberry responds well to application of nitrogenous fertilizers. Nitrogen is one of the key elements in mulberry management and silkworm nutrition. Its importance in sericulture does not need to be stressed upon in view of the high demand for the element both by the mulberry, in order to increase leaf yield and by the silkworm for silk production. In sericulture, generally emphasis is laid on mulberry cultivation and silkworm rearing. However, one important aspect often neglected is seed technology. Seed technology is important since a good seed is the basis for a good cocoon crop.

MATERIAL AND METHODS

Field experiment was carried out at Main Research Station, Hebbal, Bangalore during 2002-2003 as randomized complete block design with 9 treatments and three replications with net plot size of 25 m². The V₁ mulberry was planted with a spacing of 90 cm × 90 cm. The various sources of nitrogen through inorganic (urea) and organic [farm yard manure (FYM), green leaf manure (GLM) and castor cake (CC)] were applied at 75, 50 and 25 per cent levels in different combinations. The mulberry cultivation practices were followed as per recommended package of practices (Dandin *et al.*, 2001).

Details of quantity of organic manures applied under different treatment combinations

FYM level

75 % N FYM + 25 % N through Urea (48.91 kg FYM + 0.41 kg Urea /yr/25 sq m)

50 % N FYM + 50 % N through Urea (32.60 kg FYM + 0.82 kg Urea/yr/25 sq m)

25 % N FYM + 75 % N through Urea (16.30 kg FYM + 1.20 kg Urea/yr/25 sq m)

CC Level

75 % N CC + 25 % N through Urea [16.79 kg CC + 0.41 kg Urea/yr/25 sq m)

50 % N CC + 50 % N through Urea (11.20 kg CC + 0.82 kg Urea/yr/25 sq m)

25 % N CC + 75 % N through Urea (5.60 kg CC + 1.20 kg Urea /yr/25 sq m)

GLM Level

75 % N GLM + 25 % N through Urea (13.17 kg GLM + 0.41 kg Urea /yr/25 sq m)

50 % N GLM + 50 % N through Urea (8.78 kg GLM + 0.82 kg Urea /yr/25 sq m)

25 % N GLM + 75 % N through Urea (4.39 kg GLM + 1.20 kg Urea /yr/25 sq m)

Note:

• Urea containing 46 per cent N

• The nutrient composition of different organic manures were estimated on dry weight basis and tabulated below:

Organic manures	N (%)	P (%)	K (%)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)	Ca (%)	Mg (%)
FYM	1.15	1.46	1.5190	2335	25	126		1.0	0.06
Castor Cake*	3.35	1.24	0.90	82	1740	25	50	0.52	0.05
GLM #	4.27	0.86	1.70	145	4310	25	120	0.64	0.05

* : *Ricinus communis*

: *Glyricidia maculata*

Mulberry leaves obtained by imposing nine treatments of three replications each were fed to silkworm hybrids of the CSR₂ × CSR₄ and PM × NB₄D₂ race as per the package of practices (Anonymous, 1995) and the influence of these treatments on grainage parameters was studied. The replication value is the average of ten pupae which as taken as samples to record the pupal observations. Finally, the pooled data for five crops was statistically analysed and presented in Tables I to V.

RESULTS AND DISCUSSION

Pupal weight and pupal duration:

Significant higher pupal weight was recorded in worms fed on mulberry leaf obtained by application of 50 per cent N through FYM + 50 per cent N through urea (1.35 g), 50 per cent N through GLM + 50 per cent N through urea (1.36 g) and 50 per cent N through CC + 50 per cent N through urea (1.38 g). Among hybrids, CSR₂ × CSR₄ topped first by recording higher pupal weight (1.35, 1.36 and 1.37 g in FYM, GLM and CC levels, respectively). Among seasons, winter recorded higher pupal weight (1.36, 1.37 and 1.39 g, respectively) (Table I).

Pupal duration varied significantly due to the feeding of silkworms with mulberry leaf obtained by the application of FYM. It was significantly lower in 50 per cent N through FYM + 50 per cent N through urea (10.96 days). Silkworms reared in rainy recorded significantly shorter pupal duration (11.48 days). Interaction effect was observed between CSR₂ × CSR₄ silkworms and rainy season with respect to pupal duration (11.28 days) which resulted shorter.

Table I. Influence of various levels of nitrogen through different sources applied to mulberry on pupal weight (g / pupa) in different silkworm hybrids under different seasons.

Tableau I. Influence de niveaux variés d'azote appliqués chez le mûrier par différentes sources sur le poids nymphal (g / nymphe) chez différents hybrides du ver à soie pendant différentes saisons.

Farm yard manure (FYM) levels	Rainy (S1)		Winter (S2)		Summer (S3)		Mean	FYM levels × hybrids		FYM levels × seasons		
Niveaux de fumure (FYM)	Pluies (S1)		Hiver (S2)		Été (S3)		Moyenne	Niveaux de FYM × hybrides		Niveaux de FYM × saisons		
	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂		CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	S ₁	S ₂	S ₃
75% N-FYM + 25% N-urea	1.33	1.28	1.37	1.32	1.29	1.25	1.30	1.33	1.28	1.30	1.34	1.27
50% N-FYM + 50% N-urea	1.37	1.33	1.43	1.33	1.32	1.39	1.35	1.37	1.32	1.35	1.38	1.32
25% N-FYM + 75% N-urea	1.34	1.32	1.41	1.33	1.28	1.28	1.33	1.34	1.31	1.33	1.37	1.33
Mean (Hybrids × seasons) Moyenne (Hybrides × saisons)	1.34	1.31	1.40	1.32	1.30	1.28	-	1.35	1.30	1.33	1.36	1.29

	FYM levels (F) Niveaux FYM (F)	Hybrids (H) Hybrides (H)	Seasons (S) Saisons (S)	F × H	F × S	H × S	F × H × S
F-test	*	*	*	NS	NS	NS	NS
S.E.m ±	0.011	0.009	0.011	0.015	0.018	0.015	0.050
C.D. at 5%	0.031	0.025	0.031				

Table I. (Continued). / *Tableau I. (Suite).*

Green leaf manure (GLM) levels <i>Niveaux d'engrais vert (GLM)</i>	Rainy (S1) <i>Saison des pluies</i>		Winter (S2) <i>Hiver</i>		Summer (S3) <i>Eté</i>		Mean	GLM levels × hybrids <i>Moyenne Niveaux GLM × hybrides</i>		GLM levels × season <i>Niveaux GLM × Saisons</i>		
	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂		CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	S1	S2	S3
75% N-GLM + 25% N-urea	1.34	1.29	1.37	1.39	1.29	1.25	1.32	1.33	1.31	1.32	1.38	1.27
50% N-GLM + 50% N-urea	1.38	1.34	1.43	1.33	1.35	1.33	1.36	1.38	1.33	1.36	1.38	1.34
25% N-GLM + 75% N-urea	1.36	1.33	1.40	1.33	1.30	1.29	1.33	1.35	1.32	1.34	1.37	1.30
Mean (hybrids × seasons) <i>Moyenne (Hybrides × saisons)</i>	1.36	1.32	1.40	1.35	1.31	1.29	-	1.36	1.32	1.34	1.37	1.30
	GLM levels (G) <i>Niveaux GLM</i>		Hybrids (H) <i>Hybrides</i>		Seasons (S) <i>Saisons</i>		G × H	G × S		H × S		G × H × S
F-test	*		*		*		NS	NS		NS		NS
S.Em ±	0.011		0.009		0.011		0.016	0.019		0.016		0.050
C.D at 5%	0.032		0.026		0.032		-	-		-		-
Castor cake (CC) levels <i>Niveaux de tourteaux de ricin (CC)</i>	Rainy (S1) <i>Saison des pluies</i>		Winter (S2) <i>Hiver</i>		Summer (S3) <i>Eté</i>		Mean	CC levels × hybrids <i>Moyenne Niveaux de CC × hybrides</i>		CC levels × seasons <i>Niveaux de CC × saisons</i>		
	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂		CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	S1	S2	S3
75% N-CC + 25% N-urea	1.34	1.30	1.39	1.33	1.27	1.30	1.32	1.33	1.31	1.32	1.36	1.28
50% N-CC + 50% N-urea	1.39	1.33	1.48	1.34	1.37	1.36	1.38	1.41	1.34	1.36	1.41	1.37
25% N-CC + 75% N-urea	1.39	1.33	1.44	1.35	1.30	1.29	1.35	1.37	1.32	1.36	1.39	1.29
Mean (hybrids × seasons) <i>Moyenne (hybrides × saisons)</i>	1.37	1.32	1.44	1.34	1.31	1.39	-	1.37	1.32	1.34	1.39	1.31
	CC levels (C) <i>Niveaux CC</i>		Hybrids (H) <i>Hybrides</i>		Seasons (S) <i>Saisons</i>		C × H	C × S		H × S		C × H × S
F-test	*		*		*		NS	NS		NS		NS
S.Em ±	0.012		0.010		0.012		0.018	0.022		0.018		0.050
C.D. at 5%	0.036		0.029		0.036		-	-		-		-

Table II. Influence of various levels of nitrogen through different sources applied to mulberry on pupal duration (days) in different silkworm hybrids under different seasons.

Tableau II. Influence de niveaux variés d'azote par différentes sources appliquées chez le mûrier sur la durée nymphale (jours) chez différents hybrides du ver à soie pendant différentes saisons.

Farm yard manure (FYM) levels	Rainy (S1)		Winter (S2)		Summer (S3)		Mean	FYM levels × hybrids		FYM levels × seasons		
<i>Niveaux de fumure (FYM)</i>	<i>Pluies</i>		<i>Hiver</i>		<i>Été</i>		<i>Moyenne</i>	<i>Niveaux de FYM × hybrides</i>		<i>Niveaux de FYM × saisons</i>		
	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂		CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	S ₁	S ₂	S ₃
75% N-FYM + 25% N-urea	12.07	12.32	12.19	12.20	11.00	12.63	12.35	12.34	12.35	12.19	11.70	12.14
50% N-FYM + 50% N-urea	10.47	11.00	11.60	11.75	11.06	10.67	10.96	11.04	10.88	10.73	10.86	11.29
25% N-FYM + 75% N-urea	11.31	11.75	11.89	11.83	12.06	11.76	11.76	11.75	11.78	11.53	11.91	11.86
Mean (Hybrids × seasons) <i>Moyenne (Hybrides × Saisons)</i>	11.28	11.69	11.89	11.92	11.37	11.68	-	11.71	11.67	11.48	11.82	11.76
	FYM levels (F) <i>Niveaux FYM</i>		Hybrids (H) <i>Hybrides</i>		Seasons (S) <i>Saisons</i>		F × H	F × S		H × S	F × H × S	
F-test	*		NS		*		NS	NS		*	NS	
S.E.m ±	0.125		0.102		0.125		0.177	0.216		0.177	0.530	
C.D. at 5%	0.660		-		-		-	-		-	--	

Table II. (Continued). / *Tableau II. (Suite).*

Green leaf manure (GLM) levels	Rainy (S ₁)		Winter (S ₂)		Summer (S ₃)		Mean	GLM levels × Hybrids		GLM levels × Seasons		
Niveaux d'engrais vert (GLM)	Saison des pluies		Hiver		Eté		Moyenne	Niveaux GLM × Hybrides		Niveaux GLM × Saisons		
	CSR2 × CSR4	PM × NB4D2	CSR2 × CSR4	PM × NB4D2	CSR2 × CSR4	PM × NB4D2		CSR2 × CSR4	PM × NB4D2	S1	S2	S3
75% N- GLM + 25% N-urea	11.91	12.18	12.10	12.08	12.69	12.51	12.24	12.23	12.25	12.04	12.09	12.60
50 % N-FYM + 50% N- urea	10.96	10.91	11.55	10.85	10.99	10.52	10.96	11.17	10.76	10.93	11.20	10.75
25% N-FYM + 75% N- urea	11.13	11.51	11.85	13.18	11.92	11.65	11.87	11.63	12.11	11.32	12.52	11.78
Mean (Hybrids × Seasons)	11.33	11.53	11.83	12.04	11.86	11.56	-	11.68	11.71	11.43	11.93	11.71
Moyenne (Hybrides × Saisons)												
	CC levels (C) Niveaux CC		Hybrids (H) Hybrides		Seasons (S) Saisons		C × H	C × S		H × S		C × H × S
F-test	*		NS		NS		NS	NS		NS		NS
S.Em ±	0.230		0.188		0.230		0.325	0.398		0.325		0.980
C. D. at 5%	0.368		-		-		-	-		0.521		-
Castor cake (CC) levels	Rainy (S ₁)		Winter (S ₂)		Summer (S ₃)		Mean	GLM levels × Hybrids		GLM levels × Seasons		
Niveaux de tourteaux de ricin (CC)	Saison des pluies		Hiver		Eté		Moyenne	Niveaux GLM × Hybrides		Niveaux GLM × Saisons		
	CSR2 × CSR4	PM × NB4D2	CSR2 × CSR4	PM × NB4D2	CSR2 × CSR4	PM × NB4D2		CSR2 × CSR4	PM × NB4D2	S1	S2	S3
75% N- GLM + 25% N-urea	11.72	12.13	11.50	11.99	12.00	12.16	12.09	12.08	12.09	11.92	12.00	12.34
50 % N-FYM + 50% N- urea	10.62	10.76	11.21	12.00	10.46	11.00	10.64	10.76	10.53	10.69	10.86	10.39
25% N-FYM + 75% N- urea	11.09	11.36	11.81	11.21	11.76	11.32	11.42	11.55	11.29	11.22	11.51	11.54
Mean (Hybrids × Seasons)	11.14	11.41	11.50	11.73	11.40	11.49	-	11.46	11.30	11.28	11.46	11.42
Moyenne (Hybrides × Saisons)												
	CC levels (C) Niveaux CC		Hybrids (H) Hybrides		Seasons (S) Saisons		C × H	C × S		H × S		C × H × S
F-test	*		NS		NS		NS	NS		*		NS
SEm ±	0.128		0.105		0.128		0.181	0.222		0.181		0.980
CD at 5%	0.368		-		-		-	-		0.521		-

Table III. Influence of various levels of nitrogen through different sources applied to mulberry on moth emergence (%) in different silkworm hybrids under different seasons.

Tableau III. Influence de niveaux variés d'azote appliqués chez le mûrier par différentes sources sur l'émergence de papillons (%) chez différents hybrides du ver à soie pendant différentes saisons.

Farm yard manure (FYM) levels	Rainy (S1)		Winter (S2)		Summer (S3)		Mean	FYM levels × hybrids		FYM levels × seasons		
Niveaux de fumure (FYM)	Pluies (S1)		Hiver (S2)		Été (S3)		Moyenne	Niveaux de FYM × hybrides		Niveaux de FYM × saisons		
	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂		CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	S ₁	S ₂	S ₃
75% N-FYM + 25% N-urea	89.16 (70.79)	89.61 (69.40)	90.83 (72.31)	89.86 (75.51)	92.13 (73.73)	92.01 (73.60)	90.27 (77.91)	90.70 (72.31)	89.83 (71.50)	88.38 (70.09)	91.25 (72.83)	92.07 (73.67)
50% N-FYM + 50% N-urea	92.99 (74.86)	94.16 (76.05)	96.66 (79.62)	95.83 (78.35)	94.99 (77.39)	95.00 (77.08)	94.94 (77.22)	94.88 (77.29)	94.99 (77.16)	93.57 (75.45)	96.25 (78.99)	73.00 (74.73)
25% N-FYM + 75% N-urea	91.16 (73.04)	91.11 (72.67)	93.23 (75.10)	93.33 (75.09)	93.01 (74.67)	93.00 (74.80)	92.42 (74.23)	92.46 (74.12)	92.48 (74.19)	91.13 (72.86)	93.28 (75.12)	73.00 (74.73)
Mean (Hybrids × seasons) Moyenne (Hybrides × saisons)	91.10 (72.79)	90.66 (72.71)	93.57 (72.68)	93.01 (72.71)	93.37 (75.26)	93.34 (75.16)	-	92.68 (74.58)	92.43 (74.28)	91.03 (72.75)	93.59 (72.75)	92.69 (95.21)
	FYM levels (F) Niveaux FYM (F)		Hybrids (H) Hybrides (H)		Seasons (S) Saisons (S)		F × H	F × S		H × S		F × H × S
F-test	*		NS		*		NS	NS		NS		NS
S.E.m ±	0.446		0.364		0.446		0.630	0.772		0.630		1.890
C.D. at 5%	1.287		-		1.287		-	-		-		-

Table III. (Continued).

Tableau III. (Suite).

Green leaf manure (GLM) levels	Rainy (S1)		Winter (S2)		Summer (S3)		Mean	GLM levels × hybrids		GLM levels × season		
Niveaux d'engrais vert (GLM)	Saison des pluies		Hiver		Eté		Moyenne	Niveaux GLM × hybrides		Niveaux GLM × Saisons		
	CSR ₂ × × CSR ₄	PM × × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂		CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	S1	S2	S3
75% N-GLM + 25% N-urea	89.65 (71.26)	88.65 (70.33)	91.66 (73.25)	90.83 (72.41)	92.31 (73.95)	92.55 (74.18)	90.94 (72.26)	91.20 (72.82)	90.67 (72.31)	89.15 (70.80)	91.25 (72.83)	92.43 (74.06)
50% N-GLM + 50% N-urea	95.82 (78.27)	90.33 (77.51)	97.49 (82.46)	96.50 (79.33)	95.65 (78.05)	95.16 (77.33)	95.99 (78.83)	96.32 (79.59)	95.66 (78.06)	95.57 (77.89)	96.99 (79.90)	95.40 (77.69)
25% N-GLM + 75% N-urea	91.65 (73.58)	91.18 (92.74)	94.16 (76.08)	93.33 (75.09)	93.10 (74.79)	94.73 (76.33)	93.02 (75.72)	92.97 (74.92)	93.08 (74.99)	91.41 (73.16)	93.75 (76.20)	93.91 (75.56)
Mean (hybrids × seasons) Moyenne (Hybrides × saisons)	92.37 (74.24)	91.72 (93.54)	94.44 (77.27)	93.55 (75.61)	93.68 (75.58)	94.14 (76.25)	-	93.50 (75.70)	93.14 (75.13)	92.04 (73.90)	93.99 (76.44)	93.91 (75.91)
	GLM levels (G) Niveaux GLM		Hybrids (H) Hybrides		Seasons (S) Saisons		G × H	G × S		H × S	G × H × S	
F-test	*		NS		*		NS	*		NS	NS	
S.E.m ±	0.542		0.443		0.542		0.767	0.939		0.767	2.300	
C.D at 5%	1.566		-		1.5660		-	2.726		-	-	

Table III. (Continued).

Tableau III. (Suite).

Castor cake (CC) levels	Rainy (S1)		Winter (S2)		Summer (S3)		Mean	CC levels × hybrids		CC levels × seasons		
Niveaux de tourteaux de ricin (CC)	Saison des pluies		Hiver		Eté		Moyenne	Niveaux de CC × hybrides		Niveaux de CC × saisons		
	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB4D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB4D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB4D ₂		CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	S1	S2	S3
75% N-CC + 25% N-urea	90.81 (72.37)	89.11 (70.73)	95.20 (74.10)	91.66 (73.25)	92.58 (74.21)	92.65 (74.35)	91.55 (73.17)	91.96 (73.56)	91.14 (72.78)	89.96 (71.55)	92.08 (73.68)	92.61 (74.28)
50% N-CC + 50% N-urea	96.65 (79.69)	95.77 (78.18)	98.33 (83.74)	97.49 (82.46)	96.12 (78.70)	95.61 (78.02)	96.66 (80.12)	97.03 (80.69)	96.29 (79.53)	96.21 (78.91)	97.91 (83.10)	95.86 (78.36)
25% N-CC + 75% N-urea	92.00 (73.59)	91.86 (73.45)	95.00 (77.07)	93.43 (75.23)	93.62 (75.41)	93.56 (75.39)	93.24 (75.02)	93.54 (75.36)	92.95 (74.69)	91.93 (73.52)	94.21 (76.15)	93.59 (75.40)
Mean (hybrids × seasons) Moyenne (Hybrides × saisons)	93.15 (75.20)	92.24 (74.12)	95.27 (78.30)	94.19 (76.98)	94.10 (76.10)	93.94 (75.92)	-	94.17 (76.54)	93.46 (75.67)	92.70 (73.17)	94.73 (80.12)	94.02 (75.02)
	CC levels (C) Niveaux CC		Hybrids (H) Hybrides		Seasons (S) Saisons		C × H	C × S		H × S	C × H × S	
F-test	*		NS		*		NS	*		NS	NS	
S.E.m ±	0.562		0.459		0.562		0.795	0.973		0.795	2.380	
C.D. at 5%	1.622		-		1.622		-	2.810		-	-	

The values in parenthesis are angular transformed / Les valeurs entre parenthèses sont les valeurs angulaires transformées.

Table IV. Influence of various levels of nitrogen through different sources applied to mulberry on fecundity (eggs / DFLs) in different silkworm hybrids and seasons.

Tableau IV. Influence de niveaux variés d'azote appliqués au mûrier par différentes sources sur la fécondité (œufs / pontes saines) chez différents hybrides de vers à soie pendant différentes saisons.

Farm yard manure (FYM) levels	Rainy (S ₁)		Winter (S ₂)		Summer (S ₃)		Mean	FYM levels × Hybrid		FYM levels × Seasons		
<i>Niveaux de fumier de ferme (FYM)</i>	<i>Saison des pluies</i>		<i>Hiver</i>		<i>Été</i>		<i>Moyenne</i>	<i>Niveaux FYM</i>		<i>Niveaux FYM × saisons</i>		
	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂		CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	S ₁	S ₂	S ₃
75 % N-FYM + 25 % N- urea	452	391	559	421	463	384	445.00	491.33	398.66	421.50	490.00	423.50
50 % N-FYM + 50 % N- urea	568	486	611	510	509	483	527.83	562.66	493.00	527.00	560.50	496.00
25 % N-FYM + 75 % N- urea	481	406	587	461	481	406	470.33	516.33	424.33	443.50	524.00	443.50
Mean (Hybrids × Seasons) <i>Moyenne (hybrides × saisons)</i>	500.33	427.66	585.66	464.00	484.33	424.33	-	523.44	438.66	464.00	524.83	454.00
	FYM levels (F) <i>Niveaux FYM</i>		Hybrids (H) <i>Hybrides</i>		Seasons (S) <i>Saisons</i>		F × H	F × S		H × S	F × H × S	
F-test S.E.m ± C.D.at 5%	*		*		*		NS	NS		*	NS	
	0.359		-		0.359		-	-		0.507		

Table IV. (Continued). / *Tableau IV. (Suite).*

Green leaf manure (GLM) levels <i>Niveaux d'engrais vert (GLM)</i>	Rainy (S ₁) <i>Saison des pluies</i>		Winter (S ₂) <i>Hiver</i>		Summer (S ₃) <i>Eté</i>		Mean <i>Moyenne</i>	GLM levels × Hybrids <i>Niveaux GLM × hybrides</i>		GLM levels × Seasons <i>Niveaux GLM × saisons</i>		
	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂		CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	S ₁	S ₂	S ₃
75% N- GLM + 25% N-urea	463	390	562	399	467	386	444.66	491.33	391.88	426.50	480.83	426.50
50% N-GLM + 50% N-urea	570	491	580	530	516	490	529.55	555.44	503.66	530.50	555.16	503.00
25% N-GLM + 75% N-urea	500	410	596	466	488	421	480.16	528.00	432.33	455.00	531.00	454.50
Mean (Hybrids × Seasons) <i>Moyenne (Hybrides × Saisons)</i>	511.00	330.00	579.44	465.22	490.33	432.33	-	526.92	442.62	470.66	522.33	461.33
	GLM levels (G) <i>Niveaux GLM</i>		Hybrids (H) <i>Hybrides</i>		Seasons (S) <i>Saisons</i>		G × H	G × S		H × S	G × H × S	
F-test	*		*		*		*	NS		*	NS	
S.Em ±	7.47		6.10		7.47		10.57	12.95		10.57	31.72	
C. D. at 5%	21.46		17.52		21.46		30.35	-		30.35	-	

Castor cake (CC) levels <i>Niveaux de tourteaux de ricin (CC)</i>	Rainy (S ₁) <i>Saison des pluies</i>		Winter (S ₂) <i>Hiver</i>		Summer (S ₃) <i>Eté</i>		Mean <i>Moyenne</i>	GLM levels × Hybrids <i>Niveaux GLM × hybrides</i>		GLM levels × Seasons <i>Niveaux GLM × saisons</i>		
	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂		CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	S ₁	S ₂	S ₃
75% N-CC + 25% N-urea	470	393	569	440	470	391	455.50	503.00	408.00	431.50	504.50	430.50
50% N-CC + 50% N-urea	575	510	589	537	535	496	540.38	566.44	514.33	542.50	563.00	515.66
25% N-CC + 75% N-urea	510	431	600	480	495	536	492.00	535.00	449.00	470.50	540.00	465.50
Mean (Hybrids × saisons) <i>Moyenne (Hybrides × Saisons)</i>	518.33	444.66	586.00	585.66	500.00	441.00	-	534.81	457.11	481.50	535.83	470.55
	CC levels (C) <i>Niveaux de CC</i>		Hybrids (H) <i>Hybrides</i>		Seasons (S) <i>Saisons</i>		C × H	C × S		H × S	C × H × S	
F-test	*		*		*		NS	NS		NS	NS	
S.Em ±	6.86		5.60		6.86		9.70	11.88		9.70	29.10	
CD at 5%	19.69		16.07		19.69		-	-		-	-	

Table V. Influence of varied levels of nitrogen through different sources applied to mulberry on hatching percentage in different silkworm hybrids under different seasons

Tableau V. Influence de niveaux variés d'azote appliqués au mûrier par différentes sources sur le pourcentage d'éclosion chez différents hybrides de vers à soie pendant des saisons différentes.

Farm yard manure (FYM) levels	Rainy (S ₁)		Winter (S ₂)		Summer (S ₃)		Mean	FYM levels × Hybrids		FYM levels × Seasons		
Niveaux de fumure (FYM)	Saison des pluies		Hiver		Été		Moyenne	Niveaux FYM × hybrides		Niveaux FYM × saisons		
	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂		CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	S ₁	S ₂	S ₃
75 % N-FYM + 25 % N- urea	94.28 (76.21)	93.51 (75.30)	94.36 (76.26)	94.25 (76.12)	90.81 (72.40)	91.31 (72.68)	93.08 (74.82)	93.15 (74.95)	93.02 (74.69)	93.89 (75.75)	94.30 (76.19)	91.06 (72.86)
50 % N-FYM + 50 % N- urea	97.00 (80.03)	94.81 (76.92)	97.04 (80.29)	96.68 (79.50)	92.16 (73.76)	94.73 (76.77)	95.40 (77.88)	95.40 (78.03)	92.40 (77.63)	95.90 (78.47)	96.86 (79.89)	93.44 (75.26)
25 % N-FYM + 75 % N- urea	95.36 (77.62)	94.01 (75.86)	95.75 (78.15)	95.60 (77.90)	91.65 (73.21)	92.36 (74.06)	94.12 (76.13)	94.25 (76.33)	93.99 (75.94)	94.68 (76.74)	98.67 (78.02)	92.00 (73.63)
Mean (Hybrids × Seasons) Moyenne (Hybrides × saisons)	95.54 (77.95)	94.11 (76.02)	95.71 (78.23)	95.51 (77.84)	91.54 (73.12)	92.80 (74.56)	-	94.26 (76.44)	94.14 (76.14)	94.82 (76.99)	96.51 (78.04)	92.17 (73.84)
	FYM levels (F) Niveaux FYM		Hybrids (H) Hybrides		Seasons (S) Saisons		F × H	F × S		H × S	F × H × S	
F-test	*		NS		*		NS	NS		*	NS	
S.E.m ±	0.324		0.264		0.324		0.458	0.561		0.458	1.370	
C.D.at 5%	0.935		-		0.935		-	-		1.322	-	

Table V. (Continued).

Tableau V. (Suite).

Green leaf manure (GLM) levels	Rainy (S ₁)		Winter (S ₂)		Summer (S ₃)		Mean	GLM levels × Hybrids		GLM levels × Seasons		
Niveaux d'engrais vert (GLM)	Saison des pluies		Hiver		Eté			Niveaux GLM × hybrides		Niveaux GLM × saisons		
	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	Moyenne	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	S ₁	S ₂	S ₃
75 % N- GLM + 25 % N- urea	94.96 (77.26)	93.62 (75.39)	94.86 (76.90)	94.60 (76.57)	91.01 (72.56)	91.66 (73.22)	93.45 (75.32)	93.61 (75.57)	93.29 (75.06)	94.29 (76.33)	94.73 (76.33)	9133 (72.89)
50 % N- GLM + 50 % N- urea	97.81 (82.04)	95.16 (77.30)	97.79 (81.57)	96.74 (79.60)	92.65 (76.75)	94.11 (77.23)	96.18 (79.06)	96.69 (79.96)	95.67 (78.04)	96.48 (79.69)	97.17 (78.58)	94.88 (76.99)
25 % N- GLM + 75 % N- urea	95.81 (78.23)	94.12 (75.97)	95.98 (78.63)	95.70 (78.03)	91.73 (73.33)	92.00 (73.13)	94.30 (76.39)	94.50 (76.73)	94.11 (76.04)	94.96 (77.10)	95.84 (78.33)	92.12 (73.73)
Mean (Hybrids × Seasons) Moyenne (Hybrides × saisons)	96.19 (79.19)	94.30 (76.22)	96.21 (78.90)	95.68 (78.07)	92.46 (74.21)	92.37 (74.76)	-	94.93 (77.43)	94.36 (76.38)	95.24 (77.70)	95.91 (77.77)	92.78 (74.39)
	GLM levels (G) Niveaux GLM		Hybrids (H) Hybrides		Seasons (S) Saisons		G × H	G × S		H × S	G × H × S	
F-test	*		*		*		NS	NS		*	NS	
S.Em ±	0.381		0.311		0.381		0.539	0.661		0.539	1.620	
C.D.at 5%	1.101		0.899		1.101		-	-		1.558	-	

Table V. (Continued).

Tableau V. (Suite).

Castor cake (CC) levels	Rainy (S ₁)		Winter (S ₂)		Summer (S ₃)		Mean	CC levels × Hybrids		CC levels × Seasons		
	Saison des pluies		Hiver		Été		Moyenne	Niveaux CC × hybrides		Niveaux CC × saisons		
Niveaux de tourteaux de ricin (CC)	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ × CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂	CSR ₂ CSR ₄	PM × NB ₄ D ₂		CSR ₂ × CSR ₄	PM NB ₄ D ₂	S ₁	S ₂	S ₃
75 % N- CC + 25% N- urea	95.08 (77.23)	93.76 (75.56)	95.41 (77.64)	95.55 (77.85)	93.16 (72.66)	92.06 (73.65)	93.83 (75.77)	93.88 (75.85)	93.79 (75.69)	94.42 (76.40)	95.48 (77.74)	91.61 (73.16)
50% N-CC + 50% N -urea	98.32 (82.45)	95.68 (78.03)	98.32 (83.82)	95.16 (79.91)	96.16 (77.33)	96.76 (78.71)	97.27 (80.10)	96.25 (81.35)	97.00 (78.89)	97.62 (80.56)	97.62 (81.76)	95.66 (78.02)
25% N-CC+75% N-urea	96.14 (78.73)	94.41 (76.38)	96.10 (78.61)	95.85 (78.25)	92.01 (73.60)	92.86 (74.57)	94.56 (76.69)	94.75 (76.98)	94.37 (94.80)	95.27 (77.56)	95.97 (78.43)	92.43 (74.09)
Mean (Hybrids × Seasons Moyenne (Hybrides × saisons)	96.51 (80.02)	94.61 (78.67)	96.61 (79.96)	96.11 (76.66)	93.69 (74.54)	93.69 (75.64)	-	95.30 (78.09)	94.80 (76.99)	85.56 (78.16)	96.36 (78.18)	93.23 (75.09)
	CC levels (C)		Hybrids (H)		Seasons (S)		C × H	C × S		H × S	C × H × S	
	Niveaux CC				Hybrides			Saisons				
F-test	*		*		*		NS	NS		*	NS	
S. Em ±	0.425		0.347		0.425		0.601	0.736		0.601	1.800	
C.D. at 5%	1.226		1.001		1.226		-	-		1.734	-	

The values in parenthesis are angular transformed / Les valeurs entre parenthèses sont les valeurs angulaires transformées.

When silkworm fed on leaf obtained by application of 50 per cent N through GLM + 50 per cent N through urea recorded shorter pupal duration (10.96 days) followed by 25 per cent N through GLM + 75 per cent N through urea (11.87 days). Application of 50 per cent N through CC + 50 per cent N through urea registered shorter pupal duration (10.64 days) as compared to 25 per cent N through CC + 75 per cent through urea (11.42 days). Shorter pupal duration (11.14 days) was obtained in rainy season. Longer pupal duration (12.04 days) was observed in PM $\times$ NB₄D₂ in winter (Table II). The superiority of 50 per cent N through FYM, GLM and CC was evidenced in pupal weight and pupal duration as the leaves of these might have been nutritionally richer than other fertilized with different levels of organic and inorganic manures. Similar trend was observed by Shankar (1990), Subbarayappa *et al.*, (1992) and Manjula (1993) with regard to pupal weight, who recorded (1.290 g, 1.292 g and 1.390 g, respectively) with Calcium ammonium nitrate (CAN) fertilizer.

Moth emergence, fecundity and hatchability:

Worms fed with leaf obtained by application of 50 per cent N through FYM + 50 per cent N through urea recorded the significantly higher moth emergence (94.94%). Among rearing seasons, silkworms reared during winter were found to be superior for moth emergence (93.59%).

Moth emergence was higher at 50 per cent N through GLM + 50 per cent N through urea (95.99%). Among seasons, winter recorded highest moth emergence (93.99%). Fertilization with 50 per cent N through GLM + 50 per cent N through urea in winter resulted in the higher moth emergence (93.99%) and the interaction of treatment $\times$ season was also significant where as the lowest moth emergence were found (89.15%) with 75 per cent N through GLM + 25 per cent N through urea in winter season.

Silkworms reared on mulberry leaf obtained by the application of various doses of CC resulted in differences in moth emergences. The significantly highest moth emergence was noticed in 50 per cent N through CC + 50 per cent N through urea (96.66%). When silkworms were reared during winter they showed the highest moth emergence (94.73%). Maximum moth emergence (97.91%) was recorded in 50 per cent N through CC + 50 per cent N through urea during winter season was found to be significantly higher than all other treatments in all the seasons (Table III).

Fecundity was highest in moths emerging from pupae formed by worms fed with mulberry leaf obtained by application of 50 per cent N through FYM + 50 per cent N through urea (527.83 eggs / laying). The highest fecundity was observed in CSR₂ $\times$ CSR₄ hybrid (523.44 eggs / laying). The seasons had significant impact on the fecundity, which was highest in winter (524.83 eggs / laying). The combination of CSR₂ $\times$ CSR₄ silkworms reared in winter season resulted in the highest fecundity (585.66 eggs / laying) and the interaction between hybrids and seasons were significant.

Application of 50 per cent N through GLM + 50 per cent N through urea noticed maximum number of eggs / disease free layings (DFL's) (529.55 eggs / laying). Among hybrids CSR₂ $\times$ CSR₄ laid maximum number of eggs (526.92 eggs / laying) as compared to PM $\times$ NB₄D₂ (442.62 eggs / laying). Winter season resulted in significantly more eggs (522.33 eggs / laying). The CSR₂ $\times$ CSR₄ laid more eggs / DFL (555.44 eggs / laying) in 50 per cent N through GLM + 50 per cent N through urea treatment, which was significantly the highest when compared with all other treatment effects. Maximum eggs (579.44 eggs / laying) were recorded with CSR₂ $\times$ CSR₄ reared during winter season and minimum eggs (330.00 eggs / laying) was recorded in PM $\times$ NB₄D₂ (432.33 eggs / laying) in rainy season.

The fecundity was the highest in moths emerged from pupae formed by worms reared on mulberry leaf obtained by the application of 50 per cent N through CC + 50 per cent N through urea (540.38 eggs / laying). Among hybrids, CSR₂ $\times$ CSR₄ recorded the highest fecundity (534.81 eggs / laying) over PM $\times$ NB₄D₂ (457.11 eggs / laying). Fecundity was the highest in winter (535.83 eggs / laying) (Table IV).

Worms fed with leaf obtained by the application of 50 per cent N through GLM + 50 per cent N through urea recorded significantly higher hatching percentage (96.18%). Where as, significantly lower hatching was noticed in 75% N applied through FYM+25% N through urea (93.08%). Among

hybrids, CSR₂ × CSR₄ recorded significantly the highest hatching (94.93%). Rearing silkworms during winter had significant influence on hatchability (95.91%). CSR₂ × CSR₄ reared during winter season recorded the highest egg hatching (96.21%) and the interaction between hybrids and seasons was also significant. While the lowest egg hatching percentage (92.37%) was recorded in PM × NB₄D₂ reared in summer.

Feeding silkworm with mulberry leaves grown by applying 50 per cent N through CC + 50 per cent N through urea recorded the significantly highest hatching (97.27%). Among hybrids, CSR₂ × CSR₄ recorded significantly higher hatchability (95.30%). When silkworms were reared in winter the significantly highest hatchability (96.36%) was found. The hatchability of CSR₂ × CSR₄ reared in winter season (96.61%) was the highest and the minimum was noticed in PM × NB₄D₂ during summer season (93.69%) (Table V).

These results are in close conformity with those of Shankar *et al.* (1999) who opined that, higher fecundity with CAN was also due to higher pupal weight in CAN treated plots, since higher pupal weight results in higher fecundity with enhanced egg hatching percentage. Further, the improvement in grainage parameters could be due to the fact that, the sources provide elements like calcium other than nitrogen which may be needed for the synthesis of sulphur containing amino acids like cystine and L – methionine, which are essential for the synthesis of chorion and other proteins necessary for embryo and egg shell. However, review indicated that the decomposed rearing wastes can also be conveniently used instead of these FYM to fertilize mulberry for better grainage traits (Rajanna *et al.*, 2000).

From the present study it is clear that, the cocoon and grainage parameters of CSR₂ × CSR₄ and PM × NB₄D₂ silkworm hybrids were significantly superior when worms fed with V₁ mulberry leaves raised with combination of organic and inorganic fertilizers (50 per cent N through CC + 50 per cent N through urea, 50 per cent N through GLM + 50 per cent N through urea and 50 per cent N through FYM + 50 per cent N through urea, respectively).

REFERENCES

- ANONYMOUS (1995) Annual Report. CSR & TI, Mysore, pp, 42-48.
- DANDIN S. B., JAYASWAL J. & GIRIDHAR K. (2003) Handbook of Sericulture Technologies, CSB, Bangalore, P. 259.
- MANJULA S. K. (1993) Effect of different sources of nitrogenous fertilizers on yield and quality of mulberry leaf in relation to growth and development of silkworm, *Bombyx mori* L. and cocoon production. M.Sc. (Seri.) Thesis, UAS, Bangalore, P.146.
- RAJANNA B.H., CHINNASWAMY K.P., GOVINDAN R., SANNAPPA B. & SUNDARARAJ S. (2000) Influence of sericulture by-products and other organic manures on rearing performance of NB₄D₂ silkworm (*Bombyx mori* L.) breed. Proc. Natl. Sem. Tropic. Seric., Silkworm Management in Tropics, Eds. R. Govindan, K.P. Chinnaswamy, N.K. Krishna Prasad and D.N.R. Reddy, UAS, Bangalore, 2:192-194.
- SHANKAR M.A (1990) Nutritional management of mulberry and its effect on silkworm growth, development and silk quality. Ph. D. Thesis, UAS, Bangalore, P. 410.
- SHANKAR M.A., RANGASWAMY B.T., ANITHA PETER, MANJULA S.K. & RAJE GOWDA (1999) Effect of feeding silkworm (*Bombyx mori* L.) with mulberry obtained by different sources of nitrogen on grainage parameters of NB₄D₂. Crop Res., 18: 373-377.
- SUBBARAYAPPA C.T., KENCHANNA GOWDA S.K. & MUNIYAPPA T.V. (1992) Effect of different sources of nitrogenous fertilizers on the quality of silkworm cocoons. Mysore J. Agric. Sci., 26: 82-85.

PARAMETRES DE GRAINAGE D'HYBRIDES COMMERCIAUX DU VER A SOIE SOUS L'INFLUENCE DE NIVEAUX D'AZOTE VARIES APPORTES PAR DIFFERENTES SOURCES ORGANIQUES

**A. RAVIKUMAR, T. K. NARAYANASWAMY, M. A. SHANKAR, B. SANNAPA &
D. CHANDRAPPA**

Department of Sericulture, University of Agricultural Sciences, Bangalore – 560 065, Inde.

Les technologies de grainage sont importantes en sériciculture puisqu'une bonne graine donne une récolte de cocons productive. Nous avons entrepris une étude pour connaître l'effet de l'application de différents niveaux d'azote apportés au mûrier par des sources variées sur les paramètres de grainage. Parmi les sources d'azote, on utilise du fumier de ferme (FYM), de l'engrais vert (GLM) (Glyricidia) et du tourteau de ricin (CC) aux niveaux de 75, 50 et 25 %. L'application de 50 % de N par GLM + 50 % de N par de l'urée et de 50 % de N par du CC + 50 % de N par de l'urée donne de meilleures performances en ce qui concerne le poids nymphal, la durée nymphale, l'émergence des papillons, la fécondité et l'éclosion. Parmi les hybrides, CSR₂ × CSR₄ se classe premier en hiver en enregistrant des paramètres de grainage supérieurs par comparaison aux saisons des pluies et de l'été.

INTRODUCTION

Le mûrier répond bien à l'application d'engrais azotés. L'azote est l'un des éléments clés dans la gestion du mûrier et dans la nutrition du ver à soie. Il n'est pas nécessaire de souligner son importance en sériciculture au vue de la demande élevée pour cet élément à la fois par le mûrier, pour augmenter le rendement foliaire et par le ver à soie pour la production de soie. En sériciculture, on accorde en général une importance particulière à la culture du mûrier et à l'élevage du ver à soie. Cependant, un aspect important souvent négligé est la technologie de grainage. La technologie de grainage est importante puisqu'une bonne graine est à la base d'une bonne récolte de cocons.

MATERIEL ET METHODES

On a procédé à une expérience sur le terrain à la Station de Recherche Principale, de Hebbal, à Bangalore en 2002-2003 avec une disposition en blocs aléatoires avec 9 traitements et trois répétitions avec une surface nette de parcelle de 25 m². On plante le mûrier V1 avec un espacement de 90 cm × 90 cm. On applique les sources variées d'azote, non biologique (urée) et biologique [fumier de ferme (FYM), engrais vert (GLM) et tourteaux de ricin (CC)] à des niveaux de 75, 50 et 25 % en différentes combinaisons. On suit l'ensemble des pratiques de culture du mûrier recommandées (Dandin et coll., 2001).

Renseignements concernant la quantité d'engrais biologique appliquée avec les différentes combinaisons de traitement.

Niveau de fumier de ferme :75 % N FYM + 25 % N par de l'urée (49,81 kg FYM + 0,41 kg d'urée / année / 25 m²)50 % N FYM + 50 % N par de l'urée (32,60 kg FYM + 0,82 kg d'urée / année / 25 m²)25 % N FYM + 75 % N par de l'urée (16,30 kg FYM + 1,20 kg d'urée / année / 25 m²)**Niveau de CC :**75 % N CC + 25 % N par de l'urée (16,79 kg CC + 0,41 kg d'urée / année / 25 m²)50 % N CC + 50 % N par de l'urée (11,20 kg CC + 0,82 kg d'urée / année / 25 m²)25 % N CC + 75 % N par de l'urée (5,60 kg CC + 1,20 kg d'urée / année / 25 m²)**Niveau GLM :**75 % N GLM + 25 % N par de l'urée (13,17 kg GLM + 0,41 kg d'urée / année / 25 m²)50 % N GLM + 50 % N par de l'urée (8,78 kg GLM + 0,82 kg d'urée / année / 25 m²)25 % N GLM + 75 % N par de l'urée (4,39 kg GLM + 1,20 kg d'urée / année / 25 m²)**Note :**

L'urée contient 46 pour-cent de N.

On estime la composition en nutriments des différents engrais sur la base du poids sec et elle est présentée ci-dessous.

Engrais organiques	N (%)	P (%)	K (%)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Cu (ppm)	Mn (ppm)	Ca (%)	Mg (%)
FYM	1.15	1.46	1.5190	2335	25	126		1.0	0.06
Tourteau de ricin*	3.35	1.24	0.90	82	1740	25	50	0.52	0.05
GLM #	4.27	0.86	1.70	145	4310	25	120	0.64	0.05

* : *Ricinus communis*# : *Glyricidia maculata*

On nourrit les hybrides de vers à soie de la race CSR₂ × CSR₄ et PM × NB₄D₂ avec les feuilles de mûrier obtenues avec neuf traitements de trois répétitions chacun en suivant l'ensemble des pratiques d'élevage (Anonyme, 1995) et on étudie l'influence de ces traitements sur les paramètres de grainage. La valeur de la répétition est la moyenne de dix nymphes prises comme échantillons pour enregistrer les observations sur les nymphes. Finalement, les données regroupées pour cinq récoltes sont analysées sur le plan statistique et présentées dans les Tableaux I à V.

RESULTATS ET DISCUSSION**Poids nymphal et durée nymphale :**

On enregistre un poids nymphal considérablement plus élevé chez les vers nourris sur de la feuille de mûrier obtenue avec l'application de 50 % de N provenant de FYM + 50 % de N provenant d'urée (1,35g), 50 % de N par du GLM + 50 % de N par de l'urée (1,36 g) et 50 % de N avec CC + 50 % de N par de l'urée (1,38 g). Parmi les hybrides, CSR₂ × CSR₄ se classe premier en enregistrant le poids nymphal le plus élevé (respectivement 1,35 ; 1,36 et 1,37 g avec les niveaux de FYM, de GLM et de CC). Concernant les saisons, on enregistre le poids nymphal le plus élevé en hiver (respectivement, 1,36 ; 1,37 et 1,39 g (Tableau I).

La durée nymphale varie considérablement en fonction de l'alimentation des vers à soie avec de la feuille de mûrier obtenue par l'application de FYM. Elle est considérablement plus faible avec

50 % de N provenant de FYM + 50 % de N provenant de l'urée (10,96 jours). Les vers à soie élevés pendant la saison des pluies enregistrent une durée nymphale significativement plus courte (11,48 jours). On observe un effet d'interaction entre les vers à soie $CSR_2 \times CSR_4$ et la saison des pluies en ce qui concerne la durée nymphale (11,28 jours) qui s'avère plus courte.

Quand le ver à soie est nourri avec de la feuille obtenue par l'application de 50 % de N avec du GLM + 50 % de N par de l'urée, on enregistre une durée nymphale plus courte (10,96 jours) suivi par 25 % de N provenant de GLM + 75 % de N provenant d'urée (11,87 jours). L'application de 50 % de N provenant de CC + 50 % de N obtenu avec de l'urée donne la durée nymphale la plus courte (10,64 jours) par comparaison à 25 % de N provenant de CC + 75 % provenant d'urée (11,42 jours). On obtient la durée nymphale la plus courte (11,14 jours) pendant la saison des pluies. On observe la durée nymphale la plus longue (12,04 jours) chez $PM \times NB_4D_2$ en hiver (Tableau II). Le poids nymphal et la durée nymphale prouvent la supériorité de l'apport en N avec du FYM, du GLM et du CC ; les feuilles de mûrier correspondantes s'avèrent être plus riches sur le plan nutritionnel par rapport aux autres fertilisées avec différents niveaux d'engrais biologiques et inorganiques. Shankar (1990), Subbarayappa et coll., (1992) et Manjula (1993) ont observé une tendance similaire concernant le poids nymphal, qui est de respectivement 1,290 g ; 1,292 g et 1,390 g) avec l'engrais de nitrate d'ammo-calcium (CAN).

Emergence des papillons, fécondité et capacité d'éclosion :

Les vers nourris avec de la feuille obtenue par l'application de N provenant de FYM + 50 % de N provenant de l'urée enregistrent une émergence considérablement plus élevée de papillons (94,94 %). Concernant les saisons d'élevage, les vers à soie élevés en hiver s'avèrent supérieurs pour l'émergence de papillons (93,59 %).

L'émergence de papillons est plus élevée avec 50 % de N provenant de GLM + 50 % de N obtenu avec de l'urée (95,99 %). En ce qui concerne les saisons, l'hiver enregistre l'émergence de papillons la plus élevée (93,99 %). La fertilisation avec 50 % de N obtenu avec du GLM + 50 % de N provenant d'urée en hiver donne l'émergence de papillons la plus élevée (93,99 %) et l'interaction traitement $\times$ saison est aussi significative tandis qu'on observe l'émergence de papillons la plus faible (89,15 %) avec 75 % de N provenant de GLM + 25 % de N provenant de l'urée en hiver.

Les vers à soie élevés avec de la feuille de mûrier obtenue après l'application de doses variées de CC donnent des différences d'émergence des papillons. On observe l'émergence de papillons significativement la plus élevée avec 50 % de N provenant de CC + 50 % de N provenant d'urée (96,66 %). Quand on élève les vers à soie en hiver, ils présentent l'émergence de papillons la plus élevée (94,73 %). On enregistre l'émergence maximum de papillons (97,91 %) avec 50 % de N provenant de CC + 50 % de N provenant d'urée en hiver qui s'avère être un traitement considérablement supérieur à tous les autres traitements pendant toutes les saisons (Tableau III).

La fécondité est la plus élevée chez les papillons émergeant de nymphes formées à partir de vers nourris avec de la feuille obtenue en appliquant 50 % de N provenant de FYM + 50 % N provenant d'urée (527,83 œufs / ponte). On observe la fécondité la plus élevée chez l'hybride $CSR_2 \times CSR_4$ (523,44 œufs / ponte). Les saisons ont un impact considérable sur la fécondité, qui est plus élevée en hiver (524,83 œufs / ponte). La combinaison de vers à soie $CSR_2 \times CSR_4$ élevés en hiver donne la fécondité la plus élevée (585,66 œufs / ponte) et l'interaction entre les hybrides et les saisons est significative.

L'application de 50 % de N provenant de GLM + 50 % de N provenant d'urée donne le nombre maximum d'œufs / ponte saine (529,55 œufs / ponte). Parmi les hybrides, $CSR_2 \times CSR_4$ pondent le nombre maximum d'œufs (526,92 œufs / ponte) par comparaison à $PM \times NB_4D_2$ (442,62 œufs / ponte). La saison d'hiver donne considérablement plus d'œufs (522,33 œufs / ponte). $CSR_2 \times CSR_4$ donne plus d'œufs / ponte saine (555,44 œufs / ponte) avec 50 % de N provenant de GLM + 50 % de N par le traitement à l'urée, ce qui est significativement le plus élevé par comparaison aux effets des autres traitements. On enregistre le nombre maximum d'œufs (579,44 œufs / ponte) avec l'élevage

de CSR₂ × CSR₄ en hiver et le nombre minimum d'œufs (330 œufs / ponte) chez PM × NB₄D₂ (432,33 œufs / ponte) pendant la saison des pluies.

La fécondité est la plus élevée chez les papillons qui émergent des nymphes formées par les vers élevés sur de la feuille de mûrier obtenue par l'application de 50 % de N provenant de CC + 50 % de N provenant d'urée (540,38 œufs / ponte). Parmi les hybrides, CSR₂ × CSR₄ enregistre la fécondité la plus élevée (534,81 œufs / ponte) par rapport à PM × NB₄D₂ (457,11 œufs / ponte). La fécondité est la plus élevée en hiver (535,83 œufs / ponte) (Tableau IV).

Les vers nourris avec de la feuille obtenue par l'application de 50 % de N provenant de GLM + 50 % de N provenant d'urée enregistrent le pourcentage d'éclosion significativement le plus élevé (96,18 %). Tandis qu'on remarque une éclosion significativement plus faible avec 75 % de N appliqué par FYM + 25 % de N obtenu avec de l'urée (93,08 %). Parmi les hybrides, CSR₂ × CSR₄ enregistre l'éclosion significativement la plus élevée (94,93 %). L'élevage des vers à soie en hiver a une influence considérable sur la capacité d'éclosion (95,91 %). L'élevage de CSR₂ × CSR₄ en hiver donne l'éclosion d'œufs la plus élevée (96,21 %) et l'interaction entre les hybrides et les saisons est aussi significative. Tandis qu'on enregistre le pourcentage d'éclosion le plus faible (92,37 %) chez PM × NB₄D₂ élevé en été.

L'alimentation du ver à soie avec des feuilles de mûrier cultivées en appliquant 50 % de N provenant de CC + 50 % N provenant d'urée entraîne l'éclosion significativement la plus élevée (97,27 %). Parmi les hybrides, CSR₂ × CSR₄ donne la capacité d'éclosion significativement la plus élevée (95,30 %). Quand on élève les vers à soie en hiver, on observe la capacité d'éclosion significativement la plus élevée (96,36 %). La capacité d'éclosion de CSR₂ × CSR₄ en hiver (96,61 %) est la plus élevée et on observe qu'elle est la plus faible chez PM × NB₄D₂ pendant l'été (93,69 %) (Tableau V).

Ces résultats sont en accord étroit avec ceux de Shankar et coll. (1999) selon lesquels la fécondité plus élevée avec CAN est aussi due au poids nymphal plus élevé chez les parcelles traitées avec CAN, puisque le poids nymphal plus élevé donne une fécondité plus élevée avec une amélioration du pourcentage d'éclosion. De plus, l'amélioration des paramètres de grainage pourrait être due au fait que les sources apportent des éléments comme le calcium en plus de l'azote, qui pourraient être nécessaires pour la synthèse des acides aminés contenant du soufre comme la cystine et la L-méthionine, qui sont essentielles pour la synthèse du chorion et d'autres protéines nécessaires pour l'embryon et la coque de l'œuf. Cependant, la revue indique que l'on peut aussi commodément utiliser des déchets d'élevage décomposés au lieu de FYM pour fertiliser le mûrier afin d'obtenir de meilleurs caractères de grainage (Rajanna et coll., 2000).

D'après cette étude, il est clair que les paramètres du cocon et de grainage des hybrides de ver à soie CSR₂ × CSR₄ et de PM × NB₄D₂ sont considérablement supérieurs quand on élève des vers nourris avec des feuilles de mûrier V₁ cultivées avec un mélange d'engrais biologiques et non biologiques (respectivement 50 % de N provenant de CC + 50 % de N provenant d'urée, 50 % de N par du GLM + 50 % de N avec de l'urée et 50 % de N avec du FYM + 50 % de N avec de l'urée).

INDUCTION OF SYSTEMIC RESISTANCE IN MULBERRY AGAINST LEAF RUST (*CEROTELIUM FICI*) DISEASE BY CHEMICAL PLANT ACTIVATORS

V. P. GUPTA*, KHASRU ALAM, VINEET KUMAR, G. S. VINDHYA AND R. K. RAJAN

Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Mysore - 570 008, INDIA.

Synthetic analogs of naturally occurring plant activators i.e., Amino-n-butyric acid, Salicylic acid, Sodium salicylate, Sodium selenite, Calcium nitrate and Ferric chloride were evaluated for their ability to induce systemic resistance in susceptible mulberry variety against leaf rust disease caused by Cerotelium fici. These plant activators were applied to mulberry plants at different concentrations either as foliar spray or soil drenching prior to the challenge inoculation with C. fici. Significant ($p = 0.05$) difference in the development of leaf rust symptoms was observed with all the plant activators, their concentrations and methods of application. However, soil drenching provided better results than that of foliar spray, as higher level of disease suppression (73.15–95.33%) was observed with soil drenching than foliar spray (69.51–91.67%). Among all the plant activators, Calcium nitrate at 500 ppm was found to be the most effective, as it provided 91.67 and 95.33% disease suppression on foliar spray and soil drenching, respectively; however, it exhibited declining trend in its efficacy with increasing concentration. Except Calcium nitrate and Sodium selenite, all other plant activators exhibited rising trend in disease suppression with increasing their concentrations. Foliar spray of Sodium selenite at 1000 and 1500 ppm even caused phytotoxicity to mulberry plants. Scanning electron microscopic observations revealed that though the spores of C. fici were able to produce varying lengths of germ tubes on the leaves of treated mulberry plants, the germ tubes were not able to penetrate leaf tissues because of their inability to terminate into appressoria which are considered to be the specialized penetration structures of C. fici on mulberry leaves. It might be because of some biochemical or physiological changes occurred in treated mulberry leaves during the course of induction of systemic resistance against C. fici.

Keywords: Plant activators, induced systemic resistance, leaf rust, mulberry, SEM.

INTRODUCTION

Plants are known to synthesise endogenously various chemicals of diverse structure which play vital role in defense-signaling network. Owing to the important role of such signal molecules (the resistant gene products) in plant defence mechanisms, several successful attempts have been made to induce systemic resistance by increasing their concentration in plants through exogenous application of synthetic analogs of these naturally occurring compounds and their derivatives (Lyon *et al.*, 1995; Purkayastha, 1998; Vidhyasekaran, 1998; Oostendorp *et al.*, 2001). The basic idea behind this induced systemic resistance (ISR) is activation of unexpressed defence genes in susceptible plants by the

* Corresponding author: Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore-570 008, INDIA. Phone: +91-821-2362992, 2362406; Cell: +91-9448165466. Fax: +91-821-2362420. E-mail: guptavp1010@yahoo.com, guptavpcrti@rediffmail.com

application of inducing treatment. This exogenous treatment brings out several metabolic changes in plants which strengthen the plants to defend themselves from infection. Thus, ISR is considered to be a natural, safe, effective, durable and persistent alternative to chemical pesticides for controlling plant diseases.

Leaf rust caused by *Cerotelium fici* (Cast.) Arth. is one of the most destructive diseases of mulberry in India which not only causes damage to leaf lamina but is also responsible for premature leaf fall, resulting in severe loss in leaf yield and quality. Although chemical measures are suggested for the control of leaf rust in mulberry, they are not widely accepted among sericulturists owing to the fear of possible toxicity of chemical fungicides to silkworm and various other health hazards. Therefore, in order to develop a suitable alternative to hazardous chemical fungicides, the present study was intended to evaluate some synthetic analogs of naturally occurring plant activators for their role in elicitation of ISR in mulberry against leaf rust disease.

MATERIALS AND METHODS

Plant cultivation:

Mulberry (*Morus alba* L.) plants of var. Kanva-2, susceptible to *Cerotelium fici*, were raised from healthy stem-cuttings planted in earthen pots (30 cm diameter) containing pasteurized field soil. These plants were grown under greenhouse conditions and six-month-old plants were used for the study.

Microbial culture:

Being an obligate fungal pathogen, the culture of *Cerotelium fici* was maintained on mulberry plants itself. The spores of *C. fici* were collected from naturally infected mulberry leaves exhibiting typical rust symptoms with pin-head sized small brownish spots on adaxial surface and dark brown eruptive pustules on abaxial surface. Aqueous spore suspension (10^6 spores/mL) of *C. fici* was atomized on both the surfaces of leaves of healthy mulberry plants of var. Kanva-2, grown in pots under greenhouse conditions. On the development of leaf rust symptoms, the diseased plants were maintained under greenhouse condition and spores of *C. fici* were collected from these plants for the experimental use.

Plant activators:

Synthetic analogs of plant activators i.e., Amino-n-butyric acid (ABA), Salicylic acid (SA), Sodium salicylate (NaS), Sodium selenite (NaSel), Calcium nitrate (CaNit) and Ferric chloride (FeChl) (HiMedia Ltd., Mumbai, India) were selected to evaluate their ability in induction of systemic resistance in mulberry plants of susceptible variety against leaf rust disease. The solutions of these plant activators at 500, 1000 and 1500 ppm concentrations were prepared by dissolving their required quantity in sterilized distilled water under axenic conditions.

Induction treatments and challenge inoculation:

The well-established healthy plants (six-month-old) of mulberry var. Kanva-2 susceptible to leaf rust were pruned simultaneously to attain the similar growth. After 20 days of pruning, plant activator solutions of 500, 1000 and 1500 ppm concentrations were applied individually to mulberry plants (@ 25 mL/plant) either by foliar spray or soil drenching. Foliar spray was made with a fine atomizer, while soil drenching was done by spreading the solution uniformly on the soil-bed of the earthen pots. Plants treated with sterile distilled water (without plant activator) served as positive (healthy) and negative (diseased) controls. Each treatment had 3 replications, each consisting of 6 plants (total 18 plants per treatment).

After one week of plant activator treatments, all the treated mulberry plants were challenge-inoculated by atomizing the spore suspension (10^6 spores/mL) of *C. fici* on both the surfaces of leaves. The negative control plants were also inoculated similarly by atomizing the spore

suspension of *C. fici*, while positive control plants were left uninoculated. The whole experiment was arranged in randomized block design with different treatments and replications.

Estimation of disease development:

On *C. fici*-inoculated leaves, disease development was recorded 25 days after challenge inoculation by visually estimating the proportion of leaf lamina occupied by leaf rust symptom on a 0-5 rating scale, where 0 = no symptom, 1 = 0 - 5% leaf lamina occupied by the symptoms, 2 = 6 - 25% leaf lamina occupied by the symptoms, 3 = 26 - 50% leaf lamina occupied by the symptoms, 4 = 51 - 75% leaf lamina occupied by the symptoms and 5 = 76 - 100% leaf lamina occupied by the symptoms. Disease severity was calculated as percent disease index (PDI) by using formula: $[PDI = \{\text{Sum of numerical values} / \text{Total number of leaves observed} \times \text{Highest rating (i.e., 5)}\} \times 100]$; where numerical values were the product of the number of leaves and their respective disease-ratings (McKinney, 1923). Percentage protection against the disease was calculated as disease suppression (%) = $[(x - y) / x] \times 100$, in which x and y are disease severity (PDI) values in negative control and treated plants, respectively. Experiments were repeated twice for confirmation of results.

Plant activator-mediated induced resistance : Host-pathogen interactions:

Pathogen (*C. fici*) behaviour on the leaves of mulberry plants treated with plant activators was studied using scanning electron microscope. The observations were made on the changes (compared to negative control plants) in germination and penetration behaviour of *C. fici* on the leaves of treated mulberry plants.

For microscopic observations, the leaves collected from treated and control mulberry plants were cut into bits of about 3 mm² and fixed in 2.5% glutaraldehyde solution, prepared in 0.2 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2), for 2 hours. The bits were then washed thrice with cacodylate buffer for 15 minutes each and dehydrated in a graded ethanol-acetone series, 10 minutes per step at room temperature (25 ± 2 °C). The dehydrated material was dried in a critical-point drier (EMS 850) using CO₂ as transition fluid and then mounted over copper stubs with a double-sided sticky tape. The mounted specimens were coated with 20 nm thickness of gold in a sputter coater (EMS 550) and examined under scanning electron microscope (JEOL 100CX-II ASID-4D) at 20 kV.

Data analysis:

The experimental data from *in vivo* experiments were statistically analyzed by subjecting them to analysis of variance (ANOVA) and segregating with Duncan's multiple range test (DMRT). The significance of effect of each treatment was determined at the magnitude of 5% level.

RESULTS

Induced systemic resistance to *C. fici* in mulberry:

Leaf rust symptoms with varying degree of incidence and severity were observed on mulberry plants grown with different treatments and as negative control. However, no symptom was observed in positive (uninoculated) control plants. Significant ($p = 0.05$) difference in the development of symptoms was observed with all the plant activators tested, their concentrations (500, 1000 and 1500 ppm) and methods of application (foliar spray and soil drenching). However, application of plant activators through soil drenching provided better results than that of foliar spray, as higher level of disease suppression was observed with soil drenching than foliar spray. Except Calcium nitrate (CaNit) and Sodium selenite (NaSel), all other plant activators i.e., Amino-n-butyric acid (ABA), Salicylic acid (SA), Sodium salicylate (NaS) and Ferric chloride (FeChl) had a tendency to enhance the induction of systemic resistance in mulberry plants with increasing their concentrations, as indicated by lower PDI values or higher disease suppression with increased concentration of plant activators. However, CaNit had a declining trend in its efficacy with increasing concentration, both

as foliar spray and soil drenching. NaSel also had declining trend in its efficacy with increasing concentration but only when applied as foliar spray, whereas it had rising trend in its efficacy on soil drenching (Tables I and II).

Table I. Influence of foliar spray of plant activators on the development of leaf rust disease (*Cerotelium fici*) in mulberry plants of susceptible var. Kanva-2.

Tableau I. Influence de la vaporisation foliaire d'activateurs de plantes sur le développement de la maladie de la rouille (Cerotelium fici) chez les plants de mûrier de la variété sensible, Kanva-2.

Plant activators	Activator concentration	Percent disease Index	Disease suppression
<i>Activateurs des plantes</i>	<i>Concentration de l'activateur (ppm)</i>	<i>Indice de pourcentage de la maladie (PDI)</i>	<i>Suppression de la maladie (%)</i>
Amino-n-butyric acid <i>Acide butyrique amino-n</i> (ABA)	500 1000 1500	8.79 ^f 8.15 ^f 5.31 ^{bcde}	69.51 71.72 81.58
Salicylic acid <i>Acide salicylique</i> (SA)	500 1000 1500	6.97 ^{ef} 3.87 ^{abc} 3.02 ^{ab}	75.81 86.57 89.51
Sodium salicylate <i>Salicylate de sodium</i> (NaS)	500 1000 1500	4.34 ^{abcd} 3.38 ^{ab} 2.99 ^{ab}	84.95 88.29 89.64
Sodium selenite <i>Sélénite de sodium</i> (NaSel)	500 1000 1500	3.32 ^{ab} 4.61 ^{abcd} 6.51 ^{def}	88.47 84.00 77.40
Calcium nitrate <i>Nitrate de calcium</i> (CaNit)	500 1000 1500	2.40 ^a 2.51 ^a 2.77 ^a	91.67 91.27 90.39
Ferric chloride <i>Chlorure ferrique</i> (FeChl)	500 1000 1500	5.79 ^{cde} 3.47 ^{abc} 3.31 ^{ab}	79.90 87.96 88.50
Negative Control (Inoculated) <i>Témoin négatif (Inoculé)</i> CD (p = 0.05)	- - -	28.82 2.099	- -

The values followed by the same letters are not significantly ($p = 0.05$) different from each other according to Duncan's multiple range test (DMRT). / Les valeurs suivies par les mêmes lettres ne présentent pas de différence significative ($p = 0,05$) entre elles selon le test multiple de Duncan (DMRT).

Table II. Influence of soil drenching of plant activators on the development of leaf rust (*Cerotelium fici*) disease in mulberry plants of susceptible var. Kanva-2.

Tableau II. Influence de l'imprégnation des activateurs des plantes dans le sol sur le développement de la maladie de la rouille de la feuille (*Cerotelium fici*) chez les plants de mûrier de la variété sensible Kanva-2.

Plant Activators	Activator Concentration	Percent Disease Index	Disease Suppression
<i>Activateurs des plantes</i>	<i>Concentration de l'activateur (ppm)</i>	<i>Indice de pourcentage de la maladie (PDI)</i>	<i>Suppression de la maladie (%)</i>
Amino-n-butyric acid	500	7.74 ^g	73.15
Acide butyrique amino-n	1000	6.42 ^{efg}	77.73
(ABA)	1500	4.38 ^{bcde}	84.81
Salicylic acid	500	7.05 ^{fg}	75.54
Acide salicylique	1000	4.34 ^{bcde}	84.95
(SA)	1500	3.74 ^{abcde}	87.02
Sodium salicylate	500	6.97 ^{fg}	75.80
Salicylate de sodium	1000	4.19 ^{abc}	85.47
(NaS)	1500	3.99 ^{abcde}	86.15
Sodium selenite	500	7.06 ^{fg}	75.51
Sélénite de sodium	1000	4.06 ^{bcde}	85.91
(NaSel)	1500	3.68 ^{abcd}	87.22
Calcium nitrate	500	1.34 ^a	95.33
Nitrate de calcium	1000	1.68 ^{ab}	94.16
(CaNit)	1500	2.13 ^{abc}	92.60
Ferric chloride	500	6.32 ^{defg}	78.08
Chlorure ferrique	1000	4.55 ^{cdef}	84.22
(FeChl)	1500	3.65 ^{abcd}	87.34
Negative Control (Inoculated)	-	28.82	-
Témoin négatif (Inoculé)	-	2.329	-
CD (p = 0.05)			

The values followed by the same letters are not significantly ($p = 0.05$) different from each other according to Duncan's multiple range test (DMRT). / Les valeurs suivies par les mêmes lettres ne présentent pas de différences importantes ($p = 0.05$) entre elles selon le test multiple de Duncan (DMRT)

Soil drenching of plant activators provided significantly ($p = 0.05$) higher disease suppression of 73.15–95.33%, with the reduction of PDI to an extent of 1.34–7.74 as against 28.82 PDI in negative control plants (Table II); whereas foliar spray could provide 69.51–91.67% disease suppression, with the reduction of PDI to an extent of 2.40–8.79 (Table I).

Induction of systemic resistance by foliar spray of plant activators:

Among all the plant activators tested, foliar spray of CaNit proved to be the most effective, as it provided 90.39 to 91.67% disease suppression at different concentrations. Besides, NaS at 1000 & 1500 ppm, SA at 1500 ppm, NaSel at 500 ppm and FeChl at 1500 ppm were also significantly effective, as they provided 88.29 to 89.64% protection to mulberry plants against leaf rust infection. However, ABA at 500 ppm was the least effective which could provide comparatively lowest level of 69.51% protection to mulberry plants. Except CaNit and NaSel, all other plant activators exhibited rising trend in disease suppression with increasing their concentrations. NaSel at higher concentration of 1000 and 1500 ppm caused phytotoxicity to mulberry plants, however, it provided significantly higher protection (88.47% disease suppression) to mulberry plants at 500 ppm (Table I).

Induction of systemic resistance by soil drenching of plant activators:

Upon soil drenching, CaNit exhibited its superiority over others by providing highest degree of protection to mulberry plants against leaf rust disease. However, it was more effective at 500 ppm concentration (95.33% disease suppression) than 1000 and 1500 ppm (94.16 & 92.60% disease suppression, respectively), as it showed declining trend in its efficacy with increasing concentration. Other plant activators provided 73.15 to 87.34% disease suppression and showed rising trend in their efficacy with increasing concentration. Of these, FeChl followed by NaSel, SA and NaS at 1500 ppm provided comparatively better disease suppression (86.15 – 87.34%), whereas ABA at 500 ppm was least effective which could provide only 73.15% disease suppression (Table II). None of the plant activators at any concentration tested showed phytotoxicity to mulberry plants when applied as soil drenching.

Scanning electron microphotographs of:

Figs. 1-3: Spores of *Cerotelium fici* on mulberry leaves treated with CaNit:

Figs. 1 & 2: Protrusions of germ tubes (arrows) are seen only on some of the spores spreading near the trichomes (Tr) and stomata (St) on mulberry leaf surface;

Fig. 3: A spore gave rise to a medium size germ tube (Gt) extending on the leaf surface.

Fig. 4: One of spores of *C. fici* gave rise to a germ tube (arrow) on the surface of mulberry leaf treated with NaS while others were not properly germinated.

Fig. 5: Spores of *C. fici* gave rise to long germ tubes (Gt) on the surface of mulberry leaf treated with ABA.

Fig. 6: Formation of appressorium (Ap) by a germ tube (Gt) from the spore of *C. fici* on the surface of mulberry leaf of untreated plant.

Microphotographies électroniques à balayage des :

Figs 1-3. Spores de *Cerotelium fici* sur des feuilles de mûrier traitées avec du CaNit:

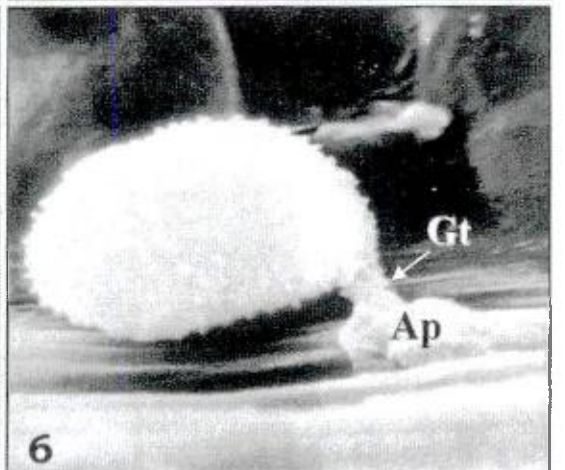
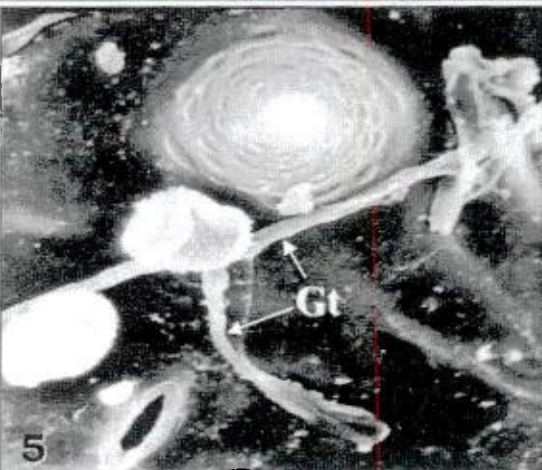
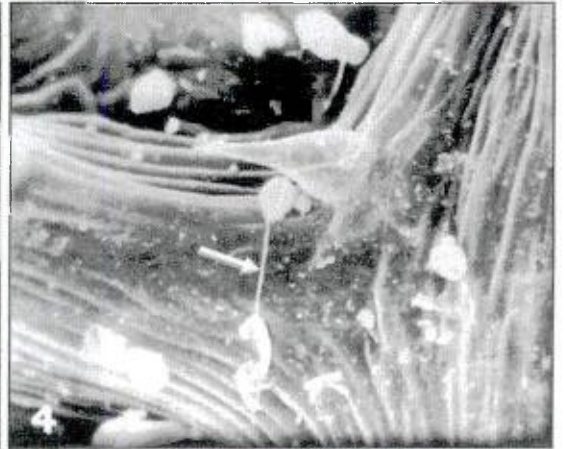
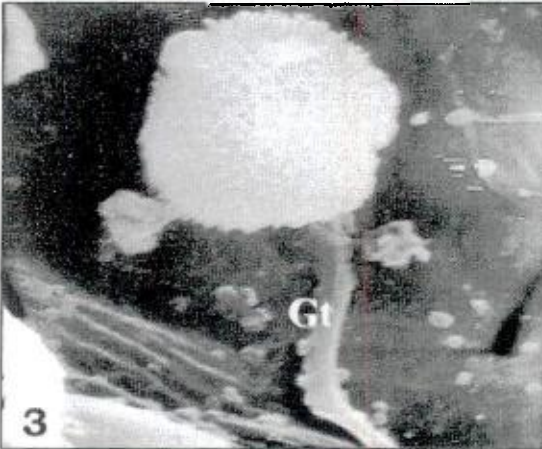
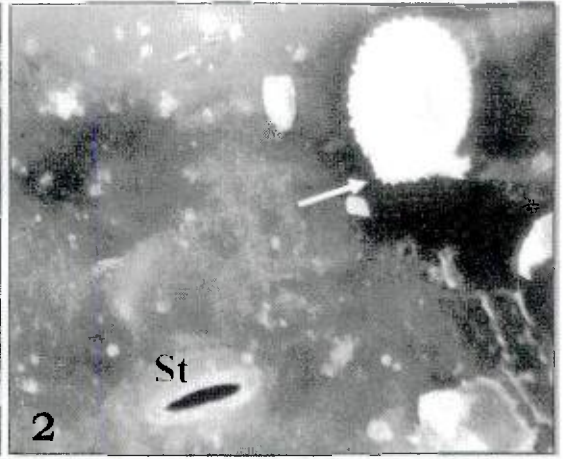
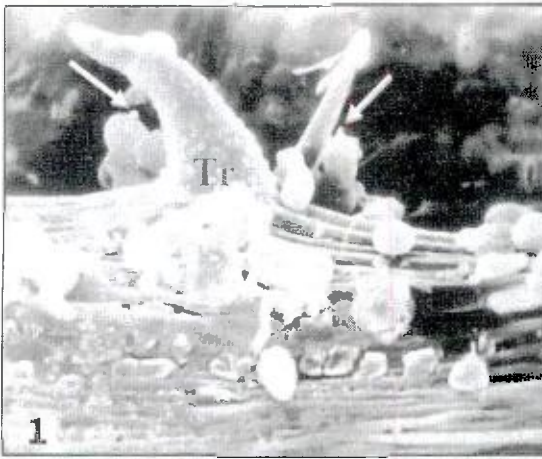
Figs. 1 & 2: On n'observe des protrusions des tubes germinatifs (flèches) que sur certaines des spores progressant vers les trichomes (Tr) et les stomates (St) sur la surface de la feuille de mûrier ;

Fig. 3. Une spore donnant naissance à un tube germinatif de taille moyenne (Gt) s'étendant sur la surface de la feuille.

Fig. 4. L'une des spores de *C. fici* donne naissance à un tube germinatif (flèche) sur la surface de la feuille de mûrier traitée avec du NaS tandis que les autres ne germent pas correctement.

Fig 5. Les spores de *C. fici* donnent naissance à de longs tubes germinatifs (Gt) sur la surface de la feuille de mûrier traitée avec de l'ABA.

Fig. 6. Formation d'appressorium (Ap) par un tube germinatif (Gt) de la spore de *C. fici* sur la surface de la feuille de mûrier du plant non traité.



Overall, among all plant activators, their concentrations and methods of application, Calcium nitrate (CaNit) at 500 ppm, both as soil drenching and foliar spray, was found to be most effective in induction of systemic resistance in susceptible mulberry var. Kanva-2 against leaf rust disease.

Host-pathogen (mulberry – *C. fici*) interactions:

The spores of *C. fici* behaved differently on the leaves of mulberry plants treated with different plant activators (Figs. 1-6). In most of the cases, though the spores of *C. fici* germinated by giving rise to small to long germ tubes; the germ tubes mostly did not terminate into appressoria (*i.e.*, penetration structure of *C. fici* on mulberry leaves). The germination of spores, producing small to medium sized germ tubes, was more on the leaves of CaNit treated plants (Figs. 1-3), whereas only few spores germinated on the leaves of NaSel and SA treated plants (Fig. 4). Very lengthy germ tubes were produced in case of ABA (Fig. 5) whereas germ tubes were small to medium sized in case of NaSel and FeChl. As far as method of application is concerned, there was not much variation in the behaviour of spores. In negative control plants, most of the spores of *C. fici* gave rise to germ tubes which later terminated into appressoria to penetrate the epidermal layer of mulberry leaves (Fig. 6) and thus caused leaf rust infection.

DISCUSSION

Plants possess inducible defense mechanisms which are responsible to provide resistance or immunity to the plants against pathogens. It is well known that signals are required to activate defense genes which are commonly present in both susceptible and resistant plants. A functional signal transduction system is needed for activation of defense genes. In resistant varieties, functional transduction system exists and hence defense genes are activated. But in susceptible interactions, signal transduction system may be non-functional and hence defense genes are not activated and enough defense chemicals are not synthesized (Vidhyasekaran, 1997).

Various kinds of diverse chemical substances that are the products of plants, pathogens or associated microflora of plants have been shown to possess ability to induce various defence related reactions in the plants. When plants are pretreated with the synthetic analogs of such chemical substances or plant activators, coordinated defence system of plants is activated against subsequent infection by the pathogen. In the present study, synthetic analogs of plant activators which are known to activate the plant defence system were evaluated for their potential in elicitation of systemic resistance in susceptible mulberry var. Kanva-2 against leaf rust (*Cerotelium fici*) disease.

Upon assaying with plant-pathosystem (mulberry-*Cerotelium fici*) under greenhouse pot culture, all the plant activators tested elicited systemic resistance in susceptible mulberry var. Kanva-2 which was evident from the significant ($p = 0.05$) reduction in PDI over untreated negative control plants. However, the degree of reduction in PDI varied with different plant activators and their concentrations. Since the selected plant activators are not known to have any fungitoxic action (Lyon *et al.*, 1995; Bhattacharyya and Roy, 1998; Gupta *et al.*, 2005), the suppression in disease development (PDI) in mulberry plants seems to be due to the probiotic action of plant activators, which might have resulted in induction of systemic resistance in susceptible mulberry variety against leaf rust infection. These observations are consistent with the earlier reports which demonstrated the induction of systemic resistance by exogenous application of chemical elicitors / activators to plants against a range of fungal, bacterial and viral pathogens in both dicotyledonous and monocotyledonous plants (Dempsey and Klessig, 1994; Lyon *et al.*, 1995; Bhattacharyya and Roy, 1998; Klessig *et al.*, 2000).

Among the plant activators tested, Calcium nitrate (CaNit) at 500 ppm was found to be the most effective, as it provided highest degree of induction of systemic resistance in susceptible mulberry variety which was evident from the reduction in PDI to 2.40 and 1.34 upon foliar spray and soil drenching, respectively, as against 28.82 PDI in untreated negative control plants. Bhattacharyya and Roy (1998) have also reported the efficacy of CaNit, Sodium selenite (NaSel) and Ferric chloride

(FeChl) in induction of systemic resistance in rice plants against sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. They observed that NaSel was more effective than CaNit and FeChl in induction of systemic resistance in rice plants against sheath blight. However, in the present study, CaNit proved to be the best in suppressing leaf rust disease in mulberry, which is consistent with the observations of Baruah (1991) who reported high efficacy of CaNit against sheath blight (*Rhizoctonia solani*) of rice.

In the present study, differences in efficacy of plant activators on the basis of their concentrations were observed which are in agreement with earlier reports (Sinha and Hait, 1982; Ghosal and Purkayastha, 1984; Manibhushanrao *et al.*, 1990). Manibhushanrao *et al.* (1990) have also recorded efficacy of some chemical plant activators at lower concentrations, as recorded in present study in the case of CaNit and NaSel. NaSel had phytotoxic effects on mulberry plants when applied as foliar spray at higher concentration of 1000 and 1500 ppm. Similar observations were also made by Bhattacharyya and Roy (1998) and Manibhushanrao *et al.* (1990) who observed the phytotoxic effect of NaSel in rice plants when applied as root dip and foliar spray.

Among the methods of application, soil drenching, in general, proved to be better than foliar spray. It may be because of the availability of elicitors in soil for longer duration than that of foliage. Since the selected plant activators are not known to be fungitoxic (Lyon *et al.*, 1995; Bhattacharyya and Roy, 1998; Gupta *et al.*, 2005), it suggests that the mechanism of disease suppression in present study is not because of the growth inhibition of *C. fici* but it seems to be due to a broad spectrum of induced systemic resistance activity of plant activators in mulberry plants against leaf rust disease. These observations are consistent with the earlier reports which demonstrated the induction of systemic resistance by exogenous application of various chemical elicitors to plants against a range of fungal, bacterial and viral pathogens (Dempsey and Klessig, 1994; Lyon *et al.*, 1995; Klessig *et al.*, 2000).

Scanning electron microscopic observations revealed the behavioural differences in spores of *C. fici* on the leaves of mulberry plants treated with different plant activators. This may be due to the biochemical or physiological changes which might have occurred in treated mulberry leaves during the course of elicitation of systemic resistance against *C. fici*. These cellular changes in mulberry leaves might have influenced the formation of appressoria by *C. fici*, as the appressorial formation by *C. fici* on mulberry leaf surface requires cellular signal (Gupta *et al.*, 1994; Benhamou and Nicole, 1999).

Thus, Calcium nitrate (CaNit) at 500 ppm may be an effective alternative to the toxic chemical fungicides presently used for the control of leaf rust (*Cerotelium fici*) disease in mulberry.

REFERENCES

- BARUAH N.J. (1991) Effect of calcium on the incidence of sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. M.Sc. Thesis, Assam Agric. Univ., Jorhat, Assam, India.
- BENHAMOU N. & NICOLE M. (1999) Cell biology of plant immunisation against microbial infection: The potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiol. Biochem.*, 37, 703-719.
- BHATTACHARYYA A. & ROY A.K. (1998) Induction of resistance in rice plant against sheath blight with non-conventional chemicals. *Indian Phytopath.*, 51, 81-86.
- DEMPSEY D.A. & KLESSIG D.F. (1994) Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends in Cell Biology*, 4, 334-338.
- GHOSAL A. & PURKAYASTHA R. (1984) Elicitation of momilactone by gibberelline in rice. *Curr. Sci.* 53, 506-507.
- GUPTA V.P., SAHU S., JHANSI LAKSHMI K., VINDHYA G S & RAJAN R.K. (2005) Induction of systemic resistance in mulberry (*Morus alba*) against leaf spot (*Cercospora moricola*) disease by chemical elicitors, pp. 201-206. In: *Advances in Tropical Sericulture*, S.B. Dandin, R.K. Mishra, V.P. Gupta and Y.S. Reddy (Eds.), National Academy of Sericultural Sciences, India, Bangalore.

- GUPTA V.P., TEWARI S.K. & DATTA R.K. (1994) Surface ultrastructure of uredinial stage of *Cerotelium fici* and its infection process on mulberry. *Mycopathologia*, 128, 99-104.
- KLESSIG D.F., DURNER J., NOAD R., NAVARRE D.A., WENDEHENNE D., KUMAR D., ZHOU J.M., SHAH J., ZHANG S., KACHROO P., TRIFA Y., PONTIER D., LAM E. & SILVA H. (2000) Nitric acid and salicylic acid signaling in plant defense. *PNAS*, 97, 8849-8855.
- LYON G.D., REGLINSKI T. & NEWTON A.C. (1995) Novel disease control compounds: the potential to 'immunize' plants against infection. *Plant Pathology*, 44, 407-427.
- MANIBHUSHANRAO K., JOE Y. & MADATHIAMMAL P. (1990) Elicitation of resistance in rice to sheath blight disease. *Int. J. Tropical Plant Dis.*, 8, 193-197.
- McKINNEY H.H. (1923) Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helmintho-sporium sativum*. *J. Agric. Res.*, 26, 195-210.
- OOSTENDORP M., KUNZ W., DIETRICH B. & STAUB T. (2001) Induced disease resistance in plants by chemicals. *European J. Pl. Path.*, 107, 19-28.
- PURKAYASTHA R.P. (1998) Disease resistance and induced immunity in plants. *Indian Phytopathol.*, 51, 211-221.
- SINHA A.K. & HAIT G.N. (1982) Host sensitization as a factor in induction of resistance in rice against *Drechslera* by seed treatment with phytoalexin inducers. *Trans. British Mycol. Soc.*, 48, 782-784.
- VIDHYASEKARAN P. (1997) Fungal Pathogenesis in Plants and Crops : Molecular Biology and Host Defense Mechanisms. Marcel Dekker, New York, USA, p. 553.
- VIDHYASEKARAN P. (1998) Molecular biology of pathogenesis and induced systemic resistance. *Indian Phytopathol.*, 51, 111-120.

INDUCTION DE LA RESISTANCE SYSTEMIQUE CONTRE LA MALADIE DE LA ROUILLE DE LA FEUILLE (*CEROTELIUM FICI*) CHEZ LE MURIER GRACE A DES ACTIVATEURS CHIMIQUES DES PLANTES

V. P. GUPTA*, KHASRU ALAM, VINEET KUMAR, G. S. VINDHYA & R. K. RAJAN

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

Nous avons évalué des analogues synthétiques d'activateurs naturels de plantes, c'est à dire l'acide amino-n-butyrique, l'acide salicylique, le salicylate de sodium, le sélénite de sodium, le nitrate de calcium et le chlorure ferrique pour leur capacité à induire la résistance systémique contre la maladie de la rouille de la feuille provoquée par *Cerotelium fici* chez une variété de murier sensible. On applique les activateurs des plantes sur les plants de murier à différentes concentrations soit par vaporisation foliaire ou imprégnation dans le sol avant l'inoculation d'attaque avec *C. fici*. On observe une différence significative ($p = 0,05$) dans le développement des symptômes de la rouille de la feuille avec tous les activateurs des plantes, concentrations et méthodes d'application. Cependant, l'imprégnation dans le sol donne de meilleurs résultats que la vaporisation foliaire, puisqu'on observe un degré plus important de suppression de la maladie (73,15 à 95,33 %) qu'avec la vaporisation foliaire (69,51 à 91,67 %). Parmi les activateurs des plantes, le nitrate de calcium à 500 ppm s'avère le plus efficace, puisqu'il supprime la maladie à 91,67 et 95,33 % par respectivement la vaporisation foliaire et l'imprégnation dans le sol ; cependant, son efficacité tend à baisser avec l'augmentation de sa concentration.. Tous les activateurs des plantes, à part le nitrate de calcium et le sélénite de sodium, présentent une tendance à l'augmentation de la suppression de la maladie lorsque leur concentration augmente. La vaporisation foliaire de sélénite de sodium à 1000 et 1500 ppm s'avère même phytotoxique pour les plants de murier. Les observations par microscopie électronique à balayage révèlent que bien que les spores de *C. fici* soient capables de produire des tubes germinatifs de longueurs variées sur les feuilles des plants de murier traités, les tubes germinatifs ne sont pas capables de pénétrer les tissus foliaires en raison de leur incapacité à se terminer en appressoria qui sont considérées comme les structures de pénétration spécialisées de *C. fici* sur les feuilles de murier. Il pourrait en être ainsi parce que certains changements biochimiques ou physiologiques se produisent chez les feuilles de murier traitées lors de l'induction de la résistance systémique à *C. fici*.

INTRODUCTION

On sait que les plantes synthétisent de manière endogène des substances chimiques variées de différentes structures qui jouent un rôle vital dans le réseau de signalisation de la défense. Grâce au rôle important de telles molécules de signal (les produits de gènes de résistance) dans les mécanismes de défense de la plante, plusieurs essais réussis ont été entrepris pour induire la résistance systémique en augmentant leur concentration dans les plantes par application exogène d'analogues synthétiques

* Auteur auquel adresser la correspondance: Central Sericultural Research and Training Institute, Srirampura, Manandavadi Road, Mysore – 570 008, INDIA. Tel : +91-821-2362992, 2362406; Portable : +91-9448165466 ax: +91-821-2362420 E-mail: guptavp1010@yahoo.com, guptavpcrti@rediffmail.com

de ces composés présents naturellement et de leurs dérivés (Lyon et coll., 1995 ; Purkayastha, 1998 ; Vidhyasekaran, 1998 ; Oostendorp et coll., 2001). L'idée de base derrière cette résistance systémique induite (ISR) est l'activation de gènes de défense inexprimés chez les plantes sensibles, par l'application d'un traitement inductif. Ce traitement exogène apporte plusieurs changements métaboliques chez les plantes, qui renforcent les plantes pour se défendre de l'infestation. On considère donc l'ISR comme une alternative naturelle persistante, sans risque, efficace, durable aux pesticides chimiques pour lutter contre les maladies des plantes.

La rouille de la feuille provoquée par *Cerotelium fici* (Cast.) Arth. est l'une des maladies les plus destructrices pour le mûrier en Inde qui entraîne non seulement des dégâts sur le limbe de la feuille mais est aussi responsable de la chute prématurée des feuilles, ce qui entraîne une perte sévère de rendement foliaire et de qualité de la feuille. Bien qu'on ait proposé des mesures chimiques pour lutter contre la rouille de la feuille chez le mûrier, elles ne sont pas bien acceptées par les sériciculteurs par peur de la toxicité possible des fongicides chimiques pour le ver à soie et de risques éventuels pour la santé. Nous avons donc entrepris cette étude pour mettre au point une alternative adaptée aux fongicides chimiques en évaluant le rôle de certains analogues synthétiques d'activateurs des plantes présents naturellement dans la provocation de l'ISR contre la rouille de la feuille chez le mûrier.

MATERIELS ET METHODES

Culture des plantes :

On obtient les plants de mûrier (*Morus alba* L.) de la variété Kanva-2, sensible à *Cerotelium fici*, à partir de boutures saines de tige plantées dans des pots en terre (diamètre de 30 cm) contenant du sol pasteurisé. On cultive ces plants sous serre et on utilise des plants de six mois pour l'étude.

Culture microbienne :

En tant que pathogène fongique obligé, on maintient la culture de *Cerotelium fici* sur des plants de mûrier. On recueille des spores de *C. fici* sur des feuilles de mûrier infestées naturellement présentant les symptômes typiques de la rouille avec de petites taches marron de la taille d'une tête d'épingle sur la surface adaxiale et des pustules marron foncé en éruption sur la surface abaxiale. On pulvérise une suspension aqueuse de spores (10^6 spores / ml) de *C. fici* sur les deux surfaces de feuilles de plants de mûrier sains de la variété Kanva-2, cultivés en pots sous serre. Au développement des symptômes de la rouille de la feuille, on maintient les plants malades sous serre et on recueille les spores de ces plantes pour l'utilisation expérimentale.

Activateurs des plantes :

On sélectionne des analogues synthétiques des activateurs des plantes comme l'acide amino-n-butyrique (ABA), l'acide salicylique (SA), le salicylate de sodium (NaS), le sélénite de sodium (NaSel), le nitrate de calcium (CaNit) et le chlorure de fer (FeChl) (HiMedia Ltd., Mumbai, Inde) pour évaluer leur capacité d'induction de la résistance systémique contre la maladie de la rouille de la feuille chez les plants de mûrier de la variété sensible. On prépare des solutions de ces activateurs à des concentrations de 500, 1000 et 1500 ppm en dissolvant la quantité requise dans de l'eau distillée stérile dans des conditions axéniques.

Traitements d'induction et inoculation d'attaque :

Simultanément, on taille des plants sains bien établis (de six mois) de la variété de mûrier Kanva-2 sensible à la rouille de la feuille pour qu'ils atteignent la même croissance. Vingt jours après la taille, on applique des solutions d'activateurs des plantes aux concentrations de 500, 1000 et 1500 ppm (à raison de 25 ml / plant) individuellement sur les plants de mûrier soit par vaporisation foliaire ou imprégnation dans le sol. On procède à la vaporisation foliaire avec un atomiseur fin tandis qu'on procède à l'imprégnation du sol en étalant la solution uniformément sur la couche de sol dans les pots

en terre. Des plants traités avec de l'eau distillée stérilisée (sans activateur de plante) servent de témoins positifs (sains) et négatifs (malades). On procède à chaque traitement en trois répétitions, chacune constituée de 6 plants (ensemble de 18 plants par traitement).

Après une semaine de traitements avec des activateurs, on procède à une inoculation d'attaque de tous les plants de mûrier en vaporisant la suspension de spores (10^6 spores / ml) de *C. fici* sur les deux surfaces des feuilles. On inocule aussi de manière similaire les plants négatifs en vaporisant la suspension de spores de *C. fici*, tandis qu'on n'inocule pas les plants témoins positifs. Toute l'expérience est disposée de manière aléatoire avec différents traitements et répétitions.

Estimation du développement de la maladie :

On enregistre le développement de la maladie sur les feuilles inoculées avec *C. fici* 25 jours après l'inoculation d'attaque en estimant visuellement la proportion de limbe de la feuille occupé par le symptôme de rouille sur une échelle de 0 à 5, où 0 = pas de symptôme, 1 = 0 à 5 % de limbe occupé, 2 = 6 à 25 % du limbe occupé, 3 = 26 à 50 % de limbe occupé, 4 = 51 à 75 % de limbe occupé et 5 = 76 à 100 % de limbe de la feuille occupé par les symptômes. On calcule la sévérité de la maladie en tant qu'indice de pourcentage de la maladie (PDI) en utilisant la formule : $[PDI = \{ \text{Somme des valeurs numériques} / \text{Nombre total de feuilles observées} \times \text{classement le plus élevé (c'est à dire 5)} \times 100 \}$; où les valeurs numériques sont le produit du nombre de feuilles et leurs classements respectifs par rapport à la maladie (Mc Kinney, 1923). On calcule le pourcentage de protection contre la maladie en tant que % de suppression de la maladie = $[(x-y) / x] \times 100$ où x et y sont les valeurs de sévérité de la maladie (PDI) respectivement chez le témoin négatif et les plants traités. On répète les expériences deux fois pour la confirmation des résultats.

Résistance induite par la médiation des activateurs de plantes : interactions hôte – pathogène :

On étudie le comportement du pathogène (*C. fici*) sur les feuilles des plants de mûrier traités avec des activateurs des plantes en utilisant la microscopie électronique à balayage. On procède aux observations sur les changements (par comparaison aux plants témoins négatifs) du comportement de germination et de pénétration de *C. fici* sur les feuilles des plants de mûrier traités.

Pour les observations microscopiques, on coupe les feuilles recueillies sur des plants de mûrier traités et témoins en petits morceaux d'environ 3 mm² et on les fixe dans une solution de glutaraldehyde, préparée dans du tampon de cacodylate de sodium 0,2 M (pH 7,2) pendant 2 heures. Puis, on lave les morceaux trois fois 15 minutes dans un tampon de cacodylate et on les déshydrate sur une série graduée d'éthanol-acétone, pendant 10 minutes par étapes à température ambiante (25 ± 2° C). On sèche le matériel déshydraté dans un séchoir à point critique (EMS 850) en utilisant le CO₂ comme fluide de transition, puis on le monte sur des plaques en cuivre avec de l'adhésif à double face. On recouvre les spécimens montés avec une couche d'or de 20 nm avec un pulvérisateur (EMS 550) et on les examine avec un microscope électronique à balayage (JEOL 100 CX-II ASID-4D) à 20 kV.

Analyse des données :

On analyse les données expérimentales sur le plan statistique à partir d'expériences *in vivo* en les soumettant à l'analyse de variance (ANOVA) et en les séparant avec le test de Duncan (DMRT). On détermine l'effet de chaque traitement avec une amplitude au seuil de 5 %.

RESULTATS

Résistance systémique à *C. fici* induite chez le mûrier :

On observe les symptômes de la rouille de la feuille avec un degré d'incidence et de sévérité variés chez les plants de mûrier cultivés avec différents traitements et chez le témoin négatif.

Cependant, on n'observe aucun symptôme chez les plants témoins positifs (non inoculés). On observe une différence significative ($p = 0,05$) dans le développement des symptômes avec tous les activateurs des plantes, concentrations (500, 1000 et 1500 ppm) et méthodes d'application testées (vaporisation foliaire et absorption par le sol). Cependant, l'application des activateurs de plantes par imprégnation dans le sol donne de meilleurs résultats que la vaporisation foliaire, puisqu'on observe un niveau plus élevé de suppression de la maladie avec l'imprégnation du sol qu'avec la vaporisation foliaire. Tous les activateurs des plantes, c'est à dire l'acide amino-n-butyrique (ABA), l'acide salicylique (SA), le salicylate de sodium (NaS) et le chlorure ferrique (FeChl) excepté le nitrate de calcium de (CaNit) et le sélénite de sodium (NaSel) ont une tendance à améliorer la résistance systémique des plants de mûrier lorsque leurs concentrations augmentent comme le montrent les valeurs plus faibles du PDI ou la suppression plus élevée de la maladie avec l'augmentation de la concentration des activateurs de plantes. Par contre, l'efficacité du Ca Nit a une tendance à baisser avec l'augmentation de la concentration, à la fois par vaporisation foliaire et imprégnation dans le sol. L'efficacité du NaSel a aussi tendance à baisser avec l'augmentation de la concentration mais seulement quand on l'applique en vaporisation foliaire, tandis que son efficacité a tendance à augmenter lorsqu'on imprègne le sol (Tableaux I et II).

L'imprégnation des activateurs dans le sol entraîne une suppression beaucoup plus élevée de la maladie ($p = 0,05$) de 73,15 à 95,33 %, avec une diminution du PDI de l'ordre de 1,34 à 7,74 contre un PDI de 28,82 chez les plants témoins négatifs (Tableau II) ; tandis que la vaporisation foliaire entraîne une suppression de la maladie de 69,51 à 91,67 %, avec une diminution du PDI de l'ordre de 2,40 à 8,79 (Tableau I).

Induction de la résistance systémique par la vaporisation foliaire des activateurs de plantes :

Parmi les activateurs des plantes testés, la vaporisation foliaire de CaNit s'avère la plus efficace puisqu'elle permet une suppression de la maladie de 90,39 à 91,67 % à différentes concentrations. Par ailleurs, le NaS à 1000 et 1500 ppm, le SA à 1500 ppm, le NaSel à 500 ppm et le FeChl à 1500 ppm s'avèrent aussi très efficaces puisqu'ils apportent une protection aux plants de mûrier de 88,29 à 89,64 % contre l'infestation par la rouille de la feuille. L'ABA à 500 ppm est le moins efficace puisqu'il apporte aux plants de mûrier le niveau de protection comparativement le plus faible de 69,51 %. A l'exception du CaNit et du NaSel, tous les autres activateurs de plantes présentent une tendance à l'augmentation de la suppression de la maladie avec l'augmentation de leurs concentrations. Le NaSel à une concentration plus élevée de 1000 et 1500 ppm entraîne une phytotoxicité pour les plants de mûrier, cependant, il apporte une protection significativement plus élevée (suppression de la maladie de 88,47 %) pour les plants de mûrier à 500 ppm (Tableau I).

Induction de la résistance systémique par imprégnation dans le sol des activateurs des plantes :

Lors de l'imprégnation dans le sol, le CaNit est supérieur aux autres en apportant le degré de protection le plus élevé des plants de mûrier contre la maladie de la rouille. Cependant, il est plus efficace à une concentration de 500 ppm (suppression de la maladie de 95,33 %) qu'à 1000 et 1500 ppm (suppression de la maladie de 94,16 et de 92,60 %). Les autres activateurs des plantes entraînent une suppression de la maladie de 73,15 à 87,34 % et présentent une tendance à l'augmentation de leur efficacité avec l'augmentation de leur concentration. Parmi eux, le FeChl suivi par le NaSel, le SA et le NaS à 1500 ppm apportent une suppression de la maladie comparativement meilleure (86,15 à 87,34 %), tandis que l'ABA à 500 ppm est moins efficace et n'apporte que 73,15 % de suppression de la maladie (Tableau II). Aucun des activateurs des plantes à n'importe quelle concentration testée n'est phytotoxique pour le mûrier lorsqu'on l'applique par imprégnation dans le sol.

Dans l'ensemble, parmi tous les activateurs de plantes, concentrations et méthodes d'application, le nitrate de calcium (CaNit) à 500 ppm, à la fois par imprégnation du sol et vaporisation foliaire,

s'avère le plus efficace pour induire la résistance systémique chez la variété de mûrier sensible, Kanva-2 contre la maladie de la rouille de la feuille.

Interactions hôte – pathogène (mûrier – *C. fici*) :

Les spores de *C. fici* se comportent différemment sur les feuilles des plants de mûrier traités avec différents activateurs des plantes (Figs. 1 à 6). Dans la plupart des cas, bien que les spores de *C. fici* germent en donnant naissance à de longs tubes germinatifs ; la plupart des tubes germinatifs ne se terminent pas en appressoria (c'est à dire la structure de pénétration de *C. fici* sur les feuilles de mûrier). La germination des spores, produisant des tubes germinatifs de taille petite à moyenne, est plus importante sur les feuilles des plants traités avec du CaNit (Figs. 1 à 3) tandis que seules quelques spores germent sur les feuilles des plants traités avec du NaS et du SA (Fig. 4). L'ABA entraîne la production de très longs tubes germinatifs (Fig. 5) tandis qu'avec le NaSel et le FeChl les tubes germinatifs sont de taille petite à moyenne. En ce qui concerne, la méthode d'application, il n'y a pas beaucoup de variation dans le comportement des spores. Chez les plants témoins négatifs, la plupart des spores de *C. fici* donnent naissance à des tubes germinatifs qui plus tard se terminent en appressoria pour pénétrer la couche épidermique des feuilles de mûrier (Fig. 6) et entraîner ainsi l'infestation par la rouille de la feuille.

DISCUSSION

Les plantes possèdent des mécanismes de défense qui se déclenchent et apportent la résistance ou l'immunité vis à vis des pathogènes. On sait qu'il faut des signaux pour activer les gènes de défense qui sont couramment présents à la fois chez les plantes sensibles et résistantes. Un système de transduction du signal fonctionnel est nécessaire pour l'activation des gènes de défense. Chez les variétés résistantes, un système de transduction fonctionnel existe, les gènes de défense sont donc activés. Mais dans les interactions sensibles, le système de transduction du signal pourrait ne pas être fonctionnel, les gènes de défense ne sont pas activés et il n'y a pas assez de substances chimiques de défense qui sont synthétisées (Vidhyasekaran, 1997).

On sait que plusieurs types de substances chimiques diverses qui sont les produits de plantes, de pathogènes ou de microflore associées aux plantes possèdent la capacité à induire plusieurs réactions liées à la défense chez les plantes. Quand les plantes sont pre-traitées avec des analogues synthétiques de substances chimiques ou des activateurs des plantes semblables, cela active le système de défense co-ordonné des plantes contre l'infestation ultérieure par le pathogène. Dans cette étude, nous avons évalué le potentiel à induire la résistance systémique contre la maladie de la rouille de la feuille (*Cerotelium fici*) d'analogues synthétiques d'activateurs des plantes connus pour activer le système de défense de la plante chez la variété de mûrier sensible Kanva-2.

Lors de l'analyse du système plante-patho (mûrier – *Cerotelium fici*) dans une culture en pots sous serre, tous les activateurs de plante testés entraînent une résistance systémique chez la var. de mûrier sensible Kanva-2, qui est évidente compte tenu de la diminution significative ($p = 0,05$) du PDI par rapport aux plants témoins négatifs non traités. Cependant, le degré de diminution du PDI varie avec les différents activateurs des plantes et concentrations. Puisque l'on sait que les activateurs des plantes sélectionnés n'ont pas d'action fongitoxique (Lyon et coll., 1995 ; Bhattacharyya et Roy, 1998 ; Gupta et coll., 2005), la suppression du développement de la maladie (PDI) chez les plants de mûrier semble être due à l'action probiotique des activateurs de plantes, qui pourrait avoir entraîné l'induction de la résistance systémique contre l'infestation par la rouille de la feuille chez la variété de mûrier sensible. Ces observations sont en accord avec des études précédentes qui ont montré l'induction de la résistance systémique par l'application exogène de déclencheurs / activateurs des plantes contre un ensemble de pathogènes fongiques, bactériens et viraux à la fois chez des plantes dicotylédones et monocotylédones (Dempsey et Klessig, 1994 ; Lyon et coll., 1995 ; Bhattacharyya et Roy, 1998 ; Klessig et coll., 2000).

Parmi les activateurs de plantes testés, le nitrate de calcium (CaNit) à 500 ppm s'avère le plus efficace, puisqu'il apporte le degré le plus élevé d'induction de résistance systémique chez la variété de mûrier sensible comme le prouve avec évidence la diminution du PDI à 2,40 et 1,34 avec respectivement la vaporisation foliaire et l'imprégnation dans le sol contre un PDI de 28,82 chez les plants témoins négatifs non traités. Bhattacharyya et Roy (1998) ont aussi rapporté l'efficacité du CaNit, du sélénite de sodium (NaSel) et du chlorure ferrique (FeChl) pour induire la résistance systémique contre la flétrissure de la gaine provoquée par *Rhizoctonia solani* chez des plants de riz. Ils ont observé que le NaSel est plus efficace que le CaNit et le FeChl pour induire la résistance systémique contre la flétrissure de la gaine chez les plants de riz. Cependant dans cette étude, le CaNit s'avère le meilleur pour supprimer la maladie de la rouille de la feuille chez le mûrier, ce qui est en accord avec les observations de Baruah (1991) qui ont rapporté une efficacité élevée du CaNit contre la flétrissure de la gaine (*Rhizoctonia solani*) chez le riz.

Dans cette étude, nous avons observé des différences d'efficacité des activateurs des plantes en fonction de leurs concentrations qui sont en accord avec des rapports précédents (Sinha et Hait, 1982 ; Ghosal et Purkayashita, 1984 ; Manibhushanrao et coll., 1990). Manibhushanrao et coll., (1990) ont aussi enregistré l'efficacité de certains activateurs chimiques des plantes à des concentrations plus faibles, comme nous l'avons enregistré dans cette étude pour le CaNit et le NaSel. Le NaSel a des effets phytotoxiques chez le mûrier quand on l'applique en vaporisation foliaire à une concentration plus élevée de 1000 et 1500 ppm. Bhattacharyya et Roy (1998) et Manibhushanrao et coll., (1990) ont aussi procédé à des observations similaires lors de leur analyse de l'effet phytotoxique du NaSel chez les plants de riz quand on l'applique à la profondeur de la racine et en vaporisation foliaire.

Parmi les méthodes d'application, l'absorption dans le sol, s'avère en général meilleure que la vaporisation foliaire. Cela pourrait être dû à la présence des activateurs dans le sol pendant une plus longue durée que sur le feuillage.

Puisque l'on sait que les activateurs des plantes sélectionnés ne sont pas fongitoxiques (Lyon et coll., 1995 ; Bhattacharyya et Roy, 1998 ; Gupta et coll., 2005), cela suggère que dans cette étude le mécanisme de suppression de la maladie ne se produit pas par l'inhibition de la croissance de *C. fici* mais semble être dû à un large spectre d'activité de résistance systémique induite contre la maladie de la rouille de mûrier par les activateurs de plantes. Ces observations sont en accord avec des rapports plus anciens qui ont montré l'induction de la résistance systémique par l'application exogène d'activateurs chimiques variés sur les plantes contre un ensemble de pathogènes fongiques, bactériens et viraux (Dempsey et Klessig, 1994 ; Lyon et coll., 1995 ; Klessig et coll., 2000).

Les observations de microscopie électronique à balayage révèlent des différences de comportement des spores de *C. fici* sur les feuilles de plants de mûrier traitées avec différents activateurs des plantes. Cela pourrait être dû aux changements biochimiques ou physiologiques qui pourraient s'être produits chez les feuilles de mûrier traitées au cours de l'activation de la résistance systémique contre *C. fici*. Ces changements cellulaires dans les feuilles de mûrier pourraient avoir influencer la formation d'appressoria par *C. fici*, puisque la formation appressoriale par *C. fici* sur la surface de la feuille de mûrier nécessite un signal cellulaire (Gupta et coll., 1994 ; Behnhamou et Nicole, 1999).

Le nitrate de calcium (CaNit) à 500 ppm pourrait donc être une alternative efficace aux fongicides chimiques toxiques utilisés jusqu'à présent pour lutter contre la maladie de la rouille de la feuille (*Cerotelium fici*) chez le mûrier.

A REVIEW OF FUNGAL DISEASES ON MULBERRY TREES (*MORUS ALBA*) IN GUILAN PROVINCE

MOSTAFA NIKNEJAD KAZEMPOUR¹ & ESMAEIL KAMRAN²

1. Department Plant Pathology, Faculty of Agricultural Sciences, Guilan University, P.O. Box.
41635-1314, Rasht – Iran. E-mail : nikkazem@yahoo.fr
2- Center of Silkworm Research, Rasht-Iran

*In the present study, identification of fungal pathogens of mulberry trees (*Morus alba*) in Guilan province during 2001–2003 was studied. After observation of disease symptoms, infected tissues were isolated and cultured. For isolation of fungi from diseased samples, small pieces of root, twig and leaf were surface sterilized with 5% hypochlorite sodium. The infected tissues were cultured on potato dextrose agar and corn meal agar containing lactic acid. The growing colonies of fungi were transferred to slides for purification and identification. Based on the morphological characters and pathogenicity test the fungi were identified as *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Lasiodiplodia theobromae* and *Rosellinia necatrix* causing root rot disease while *Alternaria solani* causing brown spot disease and *Phyllactinia guttata* causing powdery mildew and *Colletotrichum dematium* causing anthracnose. This is the first report of the occurrence of these fungi in mulberry trees in Guilan province*

Keywords: Mulberry, fungi pathogens, root rot, leaf spot, Guilan.

INTRODUCTION

Mulberry, a woody plant belonging to the genus *Morus*, family Moraceae, is widely distributed around the world. The leaves of the plant are used as food for silkworms in the sericultural industry (Yoshida *et al.*, 2002). The genus *Morus*, which is widely distributed in Asia, Europe, North and South America and Africa, is cultivated extensively in East, Central and South Asia for silk production (Awasthi *et al.*, 2004).

Mulberry is extensively planted in the Guilan province, Iran as a food source for silkworms. Production of silk products is the main source of income in this province. Mulberry and silkworm constitute the basic material for sericulture. To obtain high quantity and quality mulberry leaf, not only high yielding mulberry varieties are to be evolved and grown under optimum agronomical conditions but they are required to be protected from diseases and pests. However, rough estimates put the crop loss particularly in the tropical region due to diseases and pests of mulberry of around 5 to 10 percent while due to silkworm diseases and pests at 20 to 25 percent. Among the pathogens affecting mulberry, fungi are the predominant ones. About a dozen fungal diseases have been reported on mulberry of which 5-6 are economically important. (Anonymous, 1990).

The incidence of the fungal disease has tended to increase due to dense planting of the trees and mechanical harvesting of the shoots, which predispose plants to the disease. Control of the disease has been a major problem during mulberry cultivation. It is essential for developing effective control techniques to investigate the ecological characteristics of the disease pathogens. However, substantial studies have not been carried out on these aspects except some brief reports (Hara, 1925 ; Kimura, 1979).

The objectives of the present study are to report on the occurrence of fungal pathogens on mulberry of Guilan province and to prove their pathogenicity.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphology and cultural characteristics:

Fusarium oxysporum Schlecht.:

The pathogen was isolated from discoloured mulberry tissue. Fresh cultures appear salmon-pink, but cultures maintained on synthetic media by mass transfers become peach, pink, purple or violet. Microconidia are spherical to elongate, slightly curved, mostly unicellular, hyaline, $3-12 \times 3-3.2 \mu\text{m}$; they are produced by microphialides, swollen at the base and pointed at the tip. Macroconidia are falcate, usually 3-5 septate, $27-34 \times 3-4 \mu\text{m}$. Chlamydospores are intercalated or terminal, spherical, occurring singly or in groups of two to three, $12.5 \times 5.5-8.8 \mu\text{m}$. Sclerotia are rare in culture, dark-blue to black, 1-2 mm diameter, either distributed over the mycelium or in groups (Booth, 1971).

Fusarium solani (Mart.) Sacc.:

The pathogen was isolated from tissue of root rot of mulberry. On PDA, the growth is rapid with abundant aerial mycelium. The surface was soon with confluent sporodochia and cream colored surface. Conidiophore was unbranched and branched monophialides. Microconidia were single-celled, oval to kidney-shaped. Macroconidia were subcylindric, slightly curved, usually 3-4 septates, $29-35 \times 4-5 \mu\text{m}$. Chlamydospore were formed singly or in pairs and profusely in culture. Terminal or intercalary in hyphae and conidia (Nelson *et al.*, 1983).

Rosellinia necatrix Brel. ex Prill.:

The pathogen was isolated from infected root systems of mulberry. Characteristic pear shaped swelling (geniculations) at the septa of the stomatic hyphae are distinctive diagnostic characteristic. The fungus produces scattered black microsclerotia ($87 \times 115 \mu\text{m}$), which tend to unite and form microsclerotia sheet.

R. necatrix can survive for several years on rotted roots in the ground and occasionally as mycelium or loose microsclerotia in the soil or adhering to root debris. The fungus spreads by growth through the soil and infects roots of adjacent trees (Ogawa *et al.*, 1995). Schena and Ippolito (2003) developed a specific PCR test for *R. necatrix* detection. Two primer pairs (R10-R7 and R2-R8) were specific for *R. necatrix*, with amplification from a large number of isolates from different hosts and geographic areas but not from other fungal species, mainly isolated from soil or *Rosellinia* infected tissues.

However, to our knowledge no specific methods for *R. necatrix* detection are available. Isolation of the pathogen from infected roots is difficult due to the lack of selective media and the occurrence of a large number of saprophytic micro-organisms.

Armillaria melea (Vahl. ex Fr.) Karsten:

The pathogen was isolated from rhizomorphs and mycelial fans were obtained by removing bark and cambial tissue from decayed wood.

A fan shaped, white fungal mat often is present between the bark and the wood on the crown of affected trees. Dark brown to black thread like rhizomorphs are observed on the surface of bark. Rhizomorphs are about the size of a shoestring and also are found on dead roots, on the surface of live roots in advance of the necrotic tissue. *Armillaria* spp. might have existed in an orchard site before planting, as the mycelium may persist for many years on infected roots of removed forest trees or other tree species.

Armillaria root disease is the most common and widely distributed root disease in Colorado (Johnson, 1984). *Armillaria* species can spread somatically (clonally) underground via rhizomorphs

and diseased root systems, and mortality is often more common at the edges of expanding infection centers (Wargo and Harrington, 1991). In addition, rhizomorphs may survive in the soil or on dead infested roots.

***Rhizoctonia solani* Kühn:**

Determining the identity of fungi that do not sporulate is particularly difficult in the absence of molecular information (Gleason and McGee, 2001)

The pathogen was isolated from infected root of mulberry. Mycelium hyaline to dark, cells of mycelium long, septa of branches set off from the main hypha, sclerotia light colored and well formed (Sneh and AKIRA 1991).

***Colletotrichum dematium* (Pres. ex Fr.) Grove:**

The pathogen was isolated from necrotic spots or streak of mulberry leaves. Acervuli disk-shaped, waxy, subepidermal, typically with dark. setae abundant at the edge or among the conidiophores, conidiophores simple, conidia hyaline, 1 celled, ovoid. Colonies white to pale mouse grey. reverse dark brown, conidial masses olive grey to light vinaceous salmon. Sclerotia abundant, black, conical. Conidia falcate, fusiforme, apices acute, $9-29 \times 2.9-5.8 \mu\text{m}$. Once anthracnose symptoms occur on the leaves near the ground, the disease reaches the middle and upper leaves of mulberry trees with time.

With many anthracnose fungi belonging to the *Colletotrichum* genus, it has been reported that plant debris such as leaves (Norman and Strandberg, 1997), roots (Dillard and Cobb, 1998), and fruits (Wilson *et al.*, 1992 ; Dillard and Cobb, 1998 ;) are important sources of overwintering inoculum. Yoshida and Shirata (1999) suggest that *C. dematium* can overwinter in infected or latently infected leaves, and that these leaves can be a source of primary inoculum the following year. Hence, the elimination of fallen leaves in the field in autumn may be an effective way to prevent occurrence of the disease the following year.

***Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.:**

The pathogen was isolated from infected root tissue. Mycelium immersed or superficial, branched, septate, dark chocolate brown. To induce sporulation, isolates were grown on 2 % water agar (WA) (Biolab, S.A). Conidiomateta eustromatic, immersed or superficial, separate or aggregated and confluent. Conidia acrogenous, hyaline when young, later becoming medianly 1 euseptate, dark brown, thick walled, ellipsoid, base truncatae, with longitudinal striation from apex to base. The longer and wider conidia of *L. theobromae* are mostly $18-24 \times 13-16 \mu\text{m}$. Paraphyses hyaline, cylindrical, septate with longer $28-70 \mu\text{m}$. *L. theobromae* was identified as a species of *Lasiodiplodia* based on conidial shape and striation, which are characters typical for this genus (Arx, 1974). Mulberry is severely affected by root rot caused by *Lasiodiplodia theobromae* in over 80 per cent of mulberry gardens in Karnataka (Anonymous, 2005).

***Phyllactinia guttata* (Wall. ex Fr.) Lév.:**

A whitish powdery growth is first evident on the undersides of the leaves and eventually spreads to the entire leaf. Powdery mildew genera are distinguished by a few major morphological characters: appendage type, number of asci per ascus, and conidiophore type (Saenz and Taylor, 1999). The white mycelium had lobed appressoria. Asexual reproduction takes place by means of conidia. Sexual reproduction takes place by the formation of fruiting bodies called cleistothecia. Cleistothecia are covered with numerous colourless needle shaped appendages. Conidiophores were straight and cylindrical. Single-celled, club-shaped conidia occurred usually singly on unbranched conidiophores. Conidia ranged in length from 62 to 74 μm and in width from 11 to 16 μm . Cleistothecia with tapering appendages and a bulbous base were yellow when young and turned black at maturity. Each cleistothecium contained 5 to 9 unitunicate asci, broadly oval to ellipsoid, short-stalked, and

containing two ascospores. The size of cleistothecia ranges from 85 to 380 μm in diameter. Asci were 64 to 95 μm long and 25 to 40 μm wide. Ascospore were 15-25 $\times$ 28-34 μm . The length of appendages on cleistothecia ranged from 165 to 258 μm . Mycelial growth was observed on leaves, petioles and pedicels, but not on fruit and branches. Symptoms appeared on each plant with disease severity ranging from a few individual spots to numerous lesions almost covering whole leaf serious damage caused by powdery mildew was discovered in the main mulberry production areas of Samandag and Harbiye regions in Turkey (Kurt and Soylu, 2001).

Alternaria solani Sorauer:

The pathogen was isolated from brown spot lesions of mulberry leaves. Conidiophore arising singly or in small group, straight or flexuous, septate, brown or olivaceous brown, 113 μm long, 8 to 11 μm thick. Conidial usually solitary, straight or slightly flexuous, obclavate or with the body of the conidium oblong or ellipsoidal tapering to a beak which is commonly the same length as or rather longer than the body mid pale golden or olivaceous brown, smooth, overall length usually 230-310 μm , 17-23 μm thick in the broadest part, with 9-11 μm transverse and 0 or a few longitudinal or oblique septa; beak flexuous, sometimes branched, 2.5-5 μm thick tapering gradually.

Under favourable condition leaf spot enlarge rapidly and may eventually involve as much as half a leaf (Ellis, 1971).

CONCLUSION

Incidence of diseases, including brown spot (*Alternaria solani*) powdery mildew (*Phyllactinia guttata*), root rot (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Lasiodiplodia theobromae*, and *Rosellinia necatrix*), anthracnose (*Colletotrichum acutatum*.) was severe in cv. Ichinose. Root rot is a major disease of mulberry. Recently, this has been a major problem in the Guilan province of Iran where sericulture is practised. *R. solani*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *L. theobromae*, *R. necatrix*, *C. acutatum*, *A. solani* and *Phyllactinia guttata* were the most common fungi encountered in the North Iran grown mulberry. The reasons for this may be partly climatic. Most of the North Iran locations showing the highest incidence were found in the warmer, high rainfall, high humidity areas of Iran. This would agree with the observation that most infection seems to occur when it rains during flowering (April, May). Traditional identification is not always straightforward due to a high variability of fungal isolates caused by environmental factors (Freeman *et al.*, 2001).

REFERENCES

- ANONYMOUS. (1990) Handbook on pest and disease control of mulberry and silkworm. Union Nation, Economic and Social Commission for Asia and Pacific. Bangkok, Thailand. pp.1-15.
- ANONYMOUS. (2005) Controlling mulberry root rot the ecofriendly way. Sciences and Technology.
- AWASTHI A.K., NAGARAJA G.M., NAIK G.V., KANGINAKUDRU S., THANGAVELU K. & NAGARAJU G. (2004) Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. BMC. Genetics, 5 : 1-9.
- ARX J.A.V. (1974) The genera of fungi sporulating in pure culture. J. Cramer, Vaduz, Germany.
- BOOTH C.H. (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Inst., Kew, Surrey, England. 237 pp.
- DILLARD H.R. & COBB A. C. (1998) Survival of *Colletotrichum coccodes* in infected tomato tissue and in soil. Plant Disease, 82:235-238.
- ELLIS M. B. (1971) Dematiaceous Hyphomycetes Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 607 pp.
- FREEMAN S., MINZ D., MYMON M. & ZVEIBIL A. (2001) Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum* sensu simmonds. Phytopathology, 91 (6), 586-592.

- GLEASON F.H. & MCGEE P.A. (2001) Septal pore cap ultrastructure of fungi identified as *Epulorhiza* sp. (Sensu Sebacina) isolated from Australian orchids. *Australasian Mycologist* 20 : 12-15.
- HARA K. (1925) Pathology of practical crops. Youkendo, Tokyo, 148-149 [In Japanese].
- HERALD D. (2005) Controlling mulberry root rot the ecofriendly way. Sciences and Technology.
- JOHNSON D.W. (1984) An assessment of root diseases in the Rocky Mountain Region. Technical Report R2-29. USDA Forest Service, Rocky Mountain Region, Lakewood, CO.
- KIMURA K. (1979) The illustration of mulberry diseases in Japan. Kenpakusya, Tokyo, 79-80 [In Japanese].
- KURT S. & SOYLU S. (2001) First report of powdery mildew on mulberry caused by *Phyllactinia guttata* in the eastern Mediterranean region of Turkey. *Plant Pathology*, Vol. 50 : 797.
- NELSON P.E., TOUSSOUN T. A. & MARASAS W.F.O. (1983) *Fusarium* species : An illustrated manual for identification. Pennsylvania state University press, University Park. 193pp.
- NORMAN D. J. & STENBERG J. O. (1997) Survival of *Colletotrichum acutatum* in soil and plant debris of leather leaf fern. *Plant Disease*, 81:1177-1180.
- OGAWA J.M., ZEHR E.L., BIRD G W, RITCHIE D.F., URIU K. & UYEMOTO J.K. (1995) Compendium of Stone Fruit Diseases. APS Press. 98 pp.
- SAENZ G.S. & TAYLOR J.W. (1999) Phylogeny of the Erysiphales (powdery mildews) inferred from internal transcribed spacer ribosomal DNA sequences. *Can. J. Bot.*, 77: 150-168.
- SCHENA L. & IPPOLITO A. (2003) Rapid and sensitive detection of *Rosellinia necatrix* in roots and soils by real time scorpion-PCR. *Journal of Plant Pathology*, 85 : 15-25.
- SNEHB. & AKIRA O. (1991) Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 1991. 129 p.
- WARGO P.M. & HARRINGTON T.C. (1991) Host stress and susceptibility to *Armillaria*. *Armillaria* root rot disease In: Shaw III, C.G., Kile, G. (Eds.), *Armillaria Root Disease*. USDA Agricultural Handbook 691, Washington, DC, pp. 88-101.
- WILSON L. L., MADDEN L.V. & ELLIS M. A. (1992) Overwinter survival of *Colletotrichum acutatum* in infected strawberry fruit in Ohio. *Plant Disease*, 76:948-950.
- YOSHIDA S., SHIRATA A. & HIRADATE S. (2002) Ecological characteristics biological control of mulberry anthracnose. *JARQ*, 36: 89-95.
- YOSHIDA S. & SHIRATA A. (1999) Survival of *Colletotrichum dematium* in soil and infected mulberry leaves. *Plant Disease*, 83: 465-468.

LES MALADIES FONGIQUES DES MURIERS (*MORUS ALBA*) DANS LA PROVINCE DE GUILAN

MOSTAFA NIKNEJAD KAZEMPOUR¹ & ESMAEIL KAMRAN²

1. Department Plant Pathology, Faculty of Agricultural Sciences, Guilan University, P. O. Box 41635 – 1314, Rasht – Iran, E-mail : nikkazem@yahoo.fr

2. Centre of Silkworm Research, Rasht – Iran.

Dans cette étude, nous avons procédé à l'identification de pathogènes fongiques du mûrier (*Morus alba*) dans la province de Guilan (2001-2003). Après l'observation des symptômes de la maladie, on isole et on cultive les tissus infestés. Pour l'isolement des champignons à partir d'échantillons malades, de petits morceaux de racines, de brindilles et de feuilles sont stérilisés à la surface avec de l'hypochlorure de sodium à 5 %. On cultive les tissus infestés sur de l'agar de dextrose de pomme de terre et de l'agar de farine de maïs contenant de l'acide lactique. On transfère les colonies en croissance sur des lamelles de verre pour la purification et l'identification. D'après les caractères morphologiques et le test de pathogénicité, on a identifié les champignons *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Lasiodiplodia theobromae* et *Rosellinia necatrix* responsables de la maladie du pourrissement de la racine tandis qu'*Alternaria solani* entraîne la maladie de la tache marron, *Phyllactinia guttata* le mildiou poudreux et *Colletotrichum dematium* provoque l'anthraxose. C'est le premier rapport sur la présence de ces champignons chez les mûriers dans la province de Guilan.

INTRODUCTION

Le mûrier, une plante ligneuse appartenant au genre *Morus*, de la famille des Moraceae, est largement distribué dans le monde entier. On utilise les feuilles de la plante comme nourriture pour les vers à soie dans l'industrie séricicole (Yoshida et coll., 2002). Le genre *Morus*, qui est très répandu en Asie, en Europe, en Amérique du nord et du sud et en Afrique, est largement cultivé en Asie de l'Est, du centre et du sud pour la production de soie (Awashti et coll., 2004).

Il existe beaucoup de plantations de mûriers dans la province de Guilan, en Iran, utilisées comme source de nourriture pour les vers à soie. La production d'articles de soie est la principale source de revenus dans cette province. Le mûrier et le ver à soie constituent les matériaux de base de la sériciculture. Pour obtenir une quantité importante de feuille de mûriers de qualité, il faut non seulement mettre au point et cultiver dans des conditions agronomiques optimums des variétés de mûrier à rendement élevé mais il faut également les protéger contre les maladies et les parasites. Cependant, les estimations brutes placent les pertes de récoltes dues aux maladies et aux parasites du mûrier à environ 5 à 10 % en particulier dans la zone tropicale tandis qu'elles s'élèvent de 20 à 25 % avec les maladies et les parasites des vers à soie. Parmi les pathogènes affectant le mûrier, les champignons sont les plus répandus. On a rapporté environ une douzaine de maladies fongiques dont 5 à 6 sont importantes sur le plan économique (Anonyme, 1990).

L'incidence des maladies fongiques tend à augmenter en raison de la densité de plantation des arbres et de la récolte mécanique des pousses, qui prédisposent les plants aux maladies. Dans la culture du mûrier, la lutte contre les maladies est un problème majeur. Il est essentiel d'étudier les caractéristiques écologiques des pathogènes de la maladie pour mettre au point des techniques de lutte

efficaces. Cependant, peu d'études importantes ont été réalisées sur ces aspects sauf quelques courts rapports (Hara, 1925 ; Kimura, 1979).

Les objectifs de cette étude sont de rapporter la présence de pathogènes fongiques sur le mûrier dans la province de Guilan et de prouver leur pathogénicité.

RESULTATS ET DISCUSSION

Morphologie et caractéristiques culturales :

Fusarium oxysporum Schlecht :

On a isolé le pathogène sur du tissu de mûrier décoloré. Les cultures fraîches sont rose saumoné mais les cultures maintenues sur des milieux synthétiques par des transferts de masse, deviennent pêche, rose, pourpre ou violet. Les microconidies sont sphériques à allongées, légèrement courbées, principalement unicellulaires, hyalines de $3 \text{ à } 12 \times 3 \text{ à } 3,2 \text{ } \mu\text{m}$; elles sont produites par des microphialides, gonflés à la base et pointus à l'extrémité. Les macroconidies sont falciformes, en général avec 3 à 5 cloisons et font $27\text{-}34 \times 3\text{-}4 \text{ } \mu\text{m}$. Les chlamydospores sont intercalées ou terminales, sphériques, se produisant seules ou en groupe de deux à trois. Les sclérotés sont rares en culture, bleu foncé à noirs, d'un diamètre de 1 à 2 mm, distribués soit par-dessus le mycélium ou en groupes (Booth, 1971).

Fusarium solani (Mart.) Sacc. :

On a isolé le pathogène d'un tissu atteint par le pourrissement du mûrier. La croissance est rapide sur PDA avec un mycélium aérien abondant. La surface est bientôt recouverte par des sporodoches confluentes de couleur crème. Le conidiophore est constitué de monophialides à ramifications et sans ramifications. Les microconidies sont unicellulaires, ovales ou en forme de haricot. Les macroconidies sont subcylindriques, légèrement courbées, en général avec 3 à 4 cloisons et font de $29\text{-}35 \text{ à } 4\text{-}5 \text{ } \mu\text{m}$. Des chlamydospores se forment abondamment seules ou par deux dans la culture. Elles sont terminales et intercalées dans les hyphes et les conidies (Nelson et coll., 1983).

Rosellinia necatrix Brel. Ex. Prill. :

On a isolé le pathogène du système racinaire de mûriers infestés. Un gonflement caractéristique en forme de poire (généculations) au niveau de la cloison des hyphes stomatiques est une caractéristique distinctive de diagnostic. Le champignon produit des microsclérotés noirs parsemés ($87 \times 115 \text{ } \mu\text{m}$), qui tendent à s'unir et à former une couche de microsclérotés.

R. necatrix peut survivre pendant plusieurs années dans le sol sur des racines pourries et occasionnellement comme mycélium ou sous forme de microsclérotés dispersés dans le sol ou en adhérent aux débris de racines. Le champignon se propage par croissance dans le sol et infeste les racines des arbres contiguës (Ogawa et coll., 1995). Schena et Ippolito (2003) ont mis au point un test PCR spécifique pour la détection de *R. necatrix*. Deux paires d'amorces (R10-R7 et R2-R8) sont spécifiques à *R. necatrix*, avec une amplification pour un grand nombre d'isolats provenant d'hôtes et de zones géographiques différents mais pas d'autres espèces fongiques, principalement isolés dans le sol ou sur des tissus infestés par *Rosellinia*.

Cependant, à notre connaissance il n'existe pas de méthode spécifique de détection de *R. necatrix*. Il est difficile d'isoler le pathogène sur des racines infestées à cause du manque de milieu sélectif et de la présence d'un grand nombre de micro-organismes saprophytiques.

Armillaria melea (Vahl ex Fr.) Karsten :

On a isolé le pathogène sur des rhizomorphes et on obtient des palmes mycéliales en enlevant l'écorce et le tissu cambial du bois pourri.

Il existe souvent un tapis fongique blanc en forme d'éventail entre l'écorce et le bois sur la cime des arbres atteints. On observe des rhizoformes marron foncé à noirs en forme de fil sur la surface de

l'écorce. Les rhizomorphes sont environ de la taille d'un lacet de chaussure et on les trouve aussi sur les racines mortes et sur la surface des racines vivantes à l'avancée du tissu nécrotique. *Armillaria* spp. peut avoir été présent dans un verger avant la plantation, car il se peut que le mycélium persiste pendant de nombreuses années sur des racines infestées d'arbres de la forêt ayant été abattus ou sur d'autres espèces d'arbres.

La maladie de la racine *Armillaria* est la plus courante et c'est une maladie de la racine largement répandue dans le Colorado (Johnson, 1984). L'espèce *Armillaria* peut se répandre somatiquement (de manière clonale) sous-terre par les rhizomorphes et les systèmes racinaires malades et la mortalité est souvent plus courante aux bords des centres de l'infestation qui s'étend (Wargo et Harrington, 1991). De plus, les rhizomorphes pourraient survivre dans le sol ou sur les racines infestées mortes.

***Rhizoctonia solani* Kün :**

Il est particulièrement difficile de déterminer l'identité des champignons qui ne sporulent pas en l'absence d'information moléculaire (Gleason et McGee, 2001)

On a isolé le pathogène de la racine de mûrier infesté. Mycélium hyalin à foncé, cellules du mycélium longues, les cloisons des ramifications partent des hyphes principales, sclérotas de couleur clair et bien formés (Sneh et AKIRA 1991).

***Colletotrichum dematium* (Pres. Ex Fr.) Grove :**

On a isolé le pathogène à partir de taches ou de stries de feuilles de mûrier. Acervules en forme de disque, cireux, sous-épidermiques, typiquement avec des soies foncées abondantes au bord ou parmi les conidiophores, conidiophores simples, conidies hyaline, à une cellule, ovoïdes. Colonies blanches à gris clair, marron foncé de l'autre côté, masses conidiales gris olive à saumon-lie de vin. Sclérotas abondants, noirs, coniques. Conidies falciformes, fusiformes, sommets pointus faisant $9-29 \times 2,9-5,8 \mu\text{m}$. Une fois que les symptômes de l'antracnose se produisent sur les feuilles près du sol, la maladie atteint les feuilles du milieu et les feuilles supérieures des mûriers avec le temps.

On a rapporté chez de nombreux champignons de l'antracnose appartenant au genre *Colletotrichum*, que les débris de plantes comme les feuilles (Norman et Strandberg, 1997), les racines (Dillard et Cobb, 1998) et les fruits (Wilson et coll., 1992 ; Dillard et Cobb, 1998) sont des sources importantes d'inoculum en hibernation. Yoshida et Shirata (1999) ont suggéré que *C. dematium* peut hiberner dans des feuilles infestées ou infestées de manière latente et que ces feuilles peuvent être une source d'inoculum primaire l'année suivante. L'élimination des feuilles tombées à l'automne pourrait donc être un moyen efficace d'empêcher l'éruption de la maladie l'année suivante.

***Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Mulbl. :**

On isole le pathogène sur du tissu racinaire infesté. Mycélium immergé ou superficiel, à ramifications, à cloisons de couleur chocolat. Pour induire la sporulation, on cultive les isolats sur de l'agar à 2 % (WA) (Biolab, S. A.). Conidiomatètes eustromatiques, immergées ou superficielles, séparées ou rassemblées et confluentes. Conidies acrogènes, hyalines quand elles sont jeunes, devenant plus tard marron foncé, avec 1 cloison, à parois épaisses, ellipsoïdes, à la base tronquée et une striation longitudinale du sommet à la base. Les conidies plus longues et plus larges de *L. theobromae* font pour la plupart $18-24 \times 13-16 \mu\text{m}$. Les paraphyses sont hyalines, cylindriques, avec une cloison et font 28 à 70 μm de long. On identifie *L. theobromae* comme une espèce de *Lasiodiplodia* d'après la forme et la striation conidiale, qui sont des caractéristiques typiques de ce genre (Arx, 1974). Le mûrier est très affecté par le pourrissement de la racine provoqué par *Lasiodiplodia theobromae* dans plus de 80 % des muraies dans le Karnataka (Anonyme, 2005).

***Phyllactinia guttata* (Wall. Ex Fr.) Lév. :**

Une croissance poudreuse blanche est d'abord évidente en dessous des feuilles et elle finit par s'étendre à toute la feuille. Les genres du mildiou poudreux se distinguent par quelques

caractéristiques morphologiques principales : le type d'appendice, le nombre d'asques et le type de conidiophore (Saenz et Taylor, 1999). Le mycélyum blanc a des appressoria lobés. La reproduction asexuée a lieu au moyen des conidies. La reproduction sexuée a lieu par la formation de corps fruitiers appelés les cléistothèces. Les cléistothèces sont recouverts de nombreux appendices incolores en forme d'aiguille. Les conidiophores sont droits et cylindriques. Des conidies unicellulaires, en forme de massue se produisent habituellement séparément sur les conidiophores sans branches. Les conidies font entre 62 à 74 μm de long et entre 11 à 16 μm de large. Les cléistothèces avec des appendices effilés et une base bulbeuse sont jaunes quand ils sont jeunes et deviennent noirs à maturité. Chaque cléistothèce contient 5 à 9 asques, généralement ovales à ellipsoïdes, au pédoncule court et contenant deux ascospores. Le diamètre des cléistothèces est compris entre 85 et 380 μm . Les asques font 64 à 95 μm de long et 25 à 40 μm de large. Les ascospores font 15-25 $\times$ 28-34 μm . La longueur des appendices sur le cléistothèce est comprise entre 165 et 258 μm . On observe une croissance mycéliale sur les feuilles, les pétioles et les pédicelles, mais pas sur le fruit et les branches. Les symptômes apparaissent sur chaque plante et en fonction de la sévérité de la maladie vont de quelques taches individuelles à de nombreuses lésions couvrant presque toute la feuille ; on a observé des dégâts importants provoqués par le mildiou poudreux dans les principales zones de production du mûrier dans les régions de Samandag et Harbiye en Turquie (Kurt et Soylu, 2001).

***Alternaria solani* Sorauer :**

On isole le pathogène de lésions de la tache marron sur des feuilles de mûrier. Les conidiophores se produisent seules ou en petits groupes, sont droites ou flexueuses, à cloisons, marron ou marron olivâtre, font 113 μm de longueur, 8 à 11 μm d'épaisseur. Conidie en général solitaire, droite ou légèrement flexueuse, obclavée, ou avec le corps de la conidie oblongue ou ellipsoïde s'effilant vers un bec qui est couramment de la même longueur ou plus long que le milieu du corps, de couleur or pale ou marron olive, lisse, longueur globale d'environ 230 à 310 μm , épaisseur de 17 à 23 μm dans la plus grande partie avec des cloisons transversales de 9 à 11 μm et aucune ou quelques cloisons obliques ; bec flexueux parfois à ramifications, d'une épaisseur de 2,5 à 5 μm s'effilant progressivement.

Dans des conditions favorables, la tache de la feuille s'agrandit rapidement et peut finalement couvrir plus de la moitié de la feuille (Ellis, 1971).

CONCLUSION

L'incidence des maladies y compris de la tache marron (*Alternaria solani*), du mildiou poudreux (*Phyllactinia guttata*), du pourrissement de la racine (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Sasidiopodia theobromae* et *Rosellinia necatrix*) de l'antracnose, (*Colletotrichum acutatum*) est sévère chez le cv. Ichinose. Le pourrissement de la racine est l'une des principales maladies du mûrier. Cela a été récemment un problème majeur dans la province de Guilan en Iran, où on pratique la sériciculture. *R. solani*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *L. theobromae*, *R. necatrix*, *C. acutatum*, *A. solani* et *Phyllactinia guttata* sont les principaux champignons rencontrés chez les mûriers cultivés dans le nord de l'Iran. Cela pourrait venir de raisons partiellement climatiques. La plupart des lieux du nord de l'Iran où l'incidence est la plus élevée se trouvent dans les zones les plus chaudes, avec des précipitations élevées et une humidité importante. Cela confirme les observations selon lesquelles la plupart des infestations se produisent quand il pleut pendant la floraison (avril, mai). L'identification traditionnelle n'est pas toujours simple en raison de la variabilité des isolats fongiques provoquée par les facteurs environnementaux (Freeman et coll., 2001).

PARTHENOGENETIC DEVELOPMENT IN EXCISED EGGS OF F₁ HYBRIDS OF THE SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

DEBNIRMALYA GANGOPADHYAY & RAVINDRA SINGH

Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore -570 008, India.

*In the present study, an attempt was made to induce artificial parthenogenesis in the excised unfertilized eggs of different F₁ hybrids between bivoltine, bivoltine and polyvoltine and polyvoltine breeds of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Bivoltine hybrids showed higher rate of parthenogenesis as compared to bivoltine × polyvoltine and polyvoltine hybrids. All the parthenogenetic individuals were exclusively females.*

Keywords: *Bombyx mori* L., excised ovarian eggs, parthenogenetic development, F₁ hybrids.

INTRODUCTION

In silkworm breeding, artificial parthenogenesis acquires a special significance to give hybrids of high viability, heterosis, combining ability and phenotypically uniform populations (Strunnikov, 1986; Takei *et al.*, 1990). Recently, the genetic effects on parthenogenetic characters of the silkworm have been analyzed (Yongqiang *et al.*, 2004). Artificial parthenogenesis has also been utilized to improve the management of transformed population in a routine application of transgenesis technology in *B. mori* (Grenier *et al.*, 2004). Several attempts have been made to induce artificial parthenogenesis in the silkworm, *Bombyx mori* L. by many workers (Astaurov, 1940, 1967; Takei *et al.*, 1990; Hirokawa, 1990; Ravindra Singh *et al.*, 1994, 2004). Mechanism of hybrid vigor through artificial parthenogenesis has been reported (Ohkuma, 1971). Hybrid vigor involving homozygous lines is found to greater extent in F₁ hybrid (Nacheva *et al.*, 1999). Little information is available on parthenogenetic development in the silkworm breeds/hybrids found in India. Hence, the present study has been undertaken.

MATERIALS AND METHODS

Nine bivoltine F₁ hybrids involving 4 Japanese types (i.e. NB4D₂ × CSR₄, CSR₆ × CSR₂₆, CSR₁₉ × CSR₄, CSR₁₉ × CSR₆) and 5 Chinese types (i.e. CSR₂ × CSR₁₇, CSR₂ × CSR₂₇, CSR₃ × CSR₁₇, CSR₁₇ × CSR₁₂, CSR₁₈ × CSR₁₂) along with 6 bivoltine × polyvoltine F₁ hybrids involving Cambodge, a polyvoltine breed with golden yellow spindle shaped cocoon (i.e. NB4D₂ × Cambodge, CSR₆ × Cambodge, CSR₁₂ × Cambodge, CSR₁₇ × Cambodge, CSR₁₈ × Cambodge, CSR₁₉ × Cambodge) and 7 polyvoltine F₁ hybrids (i.e. Nistari × Cambodge, RD₁ × Cambodge, RD₁ × Nistari, BL₆₁ × BL₆₂, BL₆₇ × Nistari, 96A × BL₆₇ and 96E × Cambodge) were utilized in the present study. In each hybrid, eggs were collected from 5 ~ 15 virgin female moths depending upon the emergence. The method of Astaurov (1967) was followed for the induction of artificial parthenogenesis. Eggs were extracted from the ovarioles of freshly emerged moth, washed in running tap water, dried and kept at 25 °C and 85 % Relative Humidity (R. H.) for 12 hrs. Eggs were then treated in hot water at 46 °C for 18 min., transferred to water at room temperature for 10 min. and finally dried and incubated

at 15 °C for 72 hrs. In bivoltine hybrids, with the appearance of light brownish serosa colour, eggs were treated with hot hydrochloric acid. Latter, eggs were incubated at 25 °C and 85 % R. H. till hatching. The parthenogenetic development of eggs was identified with the appearance of reddish-brown/dark pigmentation in the serosa cells. The ratio of reddish-brown/dark pigmented eggs and total number of eggs treated was expressed as percentage of parthenogenesis.

Table I. Parthenogenetic development and hatching % in excised unfertilized eggs of different hybrids of the silkworm, *Bombyx mori* L.

Tableau I. Développement parthénogénétique et % d'éclosion d'œufs excisés non fécondés chez différents hybrides du ver à soie, Bombyx mori L.

Combination	Number of eggs treated (5 ~ 15 moths)	Parthenogenesis (%)	Hatching (%)
<i>Combinaison</i>	<i>Nbre d'œufs traités (5 à 15 papillons)</i>	<i>% de parthénogénèse</i>	<i>% d'éclosion</i>
Bivoltine hybrids / Hybrides bivoltins			
NB ₄ D ₂ × CSR ₄	3188	37.89	0.33 (98.1)
CSR ₆ × CSR ₂₆	7098	72.02	47.78 (96.4)
CSR ₁₉ × CSR ₄	4301	88.56	78.13 (98.5)
CSR ₁₉ × CSR ₆	5912	91.20	51.05 (98.4)
CSR ₂ × CSR ₁₇	3624	44.59	2.72 (98.3)
CSR ₂ × CSR ₂₇	5506	55.70	6.78 (98.9)
CSR ₃ × CSR ₁₇	1939	60.34	0.25 (98.7)
CSR ₁₇ × CSR ₁₂	3462	57.97	0.59 (96.1)
CSR ₁₈ × CSR ₁₂	3590	78.99	1.62 (98.5)
Bivoltine × polyvoltine hybrids / Hybrides bivoltins × polyvoltins			
NB ₄ D ₂ × Cambodge	3997	31.42	1.59 (99.0)
CSR ₆ × Cambodge	5509	69.08	1.02 (98.4)
CSR ₁₉ × Cambodge	2838	47.00	20.68 (98.3)
CSR ₁₂ × Cambodge	2045	64.05	- (90.5)
CSR ₁₇ × Cambodge	3705	67.20	1.20 (97.9)
CSR ₁₈ × Cambodge	8030	64.69	6.35 (98.5)
Polyvoltine hybrids / Hybrides polyvoltins			
Nistari × Cambodge	1806	54.15	- (95.6)
RD ₁ × Cambodge	1719	72.94	- (91.8)
RD ₁ × Nistari	1580	73.10	- (97.5)
BL ₆₁ × BL ₆₂	2435	56.87	- (91.5)
BL ₆₇ × Nistari	4044	50.12	- (92.7)
96A × BL ₆₇	5655	34.34	1.23 (89.8)
96E × Cambodge	1915	38.90	2.68 (93.3)

Values in parentheses are hatching % in bisexual F₁ hybrids. / Les valeurs entre parenthèses sont le % d'éclosion chez les hybrides bixexuels F₁.

Data were recorded for number of pigmented eggs, number of non-pigmented eggs, total number of eggs treated, parthenogenesis % and hatching %.

RESULTS AND DISCUSSION

Comparative induction of artificial parthenogenesis in the excised unfertilized eggs of different bivoltine, bivoltine $\times$ polyvoltine and polyvoltine F₁ hybrids is presented in Table I. The Japanese type bivoltine hybrids showed more pronounced parthenogenetic development. CSR₁₉ $\times$ CSR₆ showed maximum percentage of parthenogenetic development (91.20 %) followed by CSR₁₉ $\times$ CSR₄ (88.56 %). Maximum hatching % was recorded in CSR₁₉ $\times$ CSR₄ (78.13 %) followed by CSR₁₉ $\times$ CSR₆ (51.05 %) and CSR₆ $\times$ CSR₂₆ (47.78 %). Among the Chinese type bivoltine hybrids, maximum percentage of parthenogenetic development was observed in CSR₁₈ $\times$ CSR₁₂ (78.99 %) followed by CSR₃ $\times$ CSR₁₇ (60.34 %) and CSR₁₇ $\times$ CSR₁₂ (57.97 %) whereas hatching % was maximum in CSR₂ $\times$ CSR₂₇ (6.78 %) followed by CSR₂ $\times$ CSR₁₇ (2.72 %). Maximum percentage of parthenogenetic development was observed in CSR₆ $\times$ Cambodge (69.08 %) followed by CSR₁₇ $\times$ Cambodge (67.20 %), however, hatching % in those hybrids was not satisfactory. Hatching % was higher in CSR₁₉ $\times$ Cambodge (20.68 %) whereas it was relatively lower in CSR₁₈ $\times$ Cambodge (6.35 %). Among the 7 polyvoltine hybrids, higher percentage for parthenogenetic development was recorded in RD₁ $\times$ Nistari (73.10 %), RD₁ $\times$ Cambodge (72.94 %), BL₆₁ $\times$ BL₆₂ (56.87 %), Nistari $\times$ Cambodge (54.15 %) and BL₆₇ $\times$ Nistari (50.12 %) while hatching was not observed. The two hybrids, 96A $\times$ BL₆₇ and 96E $\times$ Cambodge though with poor performance towards parthenogenetic development (34.34 % and 38.90 % respectively), showed less hatchability of 1.23 % to 2.68 % respectively.

In the present study, some of the prospective hybrids i.e. CSR₁₉ $\times$ CSR₄, CSR₁₉ $\times$ CSR₆, CSR₆ $\times$ CSR₂₆, CSR₁₉ $\times$ Cambodge, CSR₂ $\times$ CSR₂₇, and CSR₁₈ $\times$ Cambodge were identified based on their better response towards artificial parthenogenesis. A great deal of variation towards parthenogenetic development and hatching in the excised unfertilized eggs of different bivoltine, bivoltine $\times$ polyvoltine and polyvoltine hybrids has been observed. Parthenogenetic development in silkworm breeds/hybrids has been reported (Hirokawa, 1990; Ravindra Singh *et al.*, 1994, 2002). Data in the present study clearly revealed that Japanese type bivoltine hybrids were more pronounced towards parthenogenesis. The results are in conformity with that of Ravindra Singh *et al.* (1994). Shinbo *et al.* (1991) have observed considerable strain differences in parthenogenetic ability in the silkworm breed.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial assistance from the Department of Science and Technology, New Delhi is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- ASTAUROV, B. L. (1940) Artificial parthenogenesis in the silkworm (*Bombyx mori* L.) (Experimental study). Accademia delle Scienze Dell'urss. pp. 221–240.
- ASTAUROV, B. L. (1967) Experimental alterations of the developmental cytogenetic mechanisms in mulberry silkworm: Artificial parthenogenesis, polyploidy, gynogenesis and androgenesis. Adv. Morphogen. 6, 199–257.
- GRENIER A. -M., ROCHA M. D., JALABERT A. ROYER C., MAUCHAMP B. & CHAVANCY G. (2004) Artificial parthenogenesis and control of voltinism to manage transgenic populations in *Bombyx mori* L. J. Insect Physiol., 50 (8), 751–760.
- HIROKAWA M. (1990) Selection of the high parthenogenetic lines and examinations of their practical characters in commercial F₁ hybrid races of the silkworm, *Bombyx mori*. Bull. Fukushima Seric. Exp. Stn., 24, 1–6.

- NACHEVA Y., PETKOV N., TZENOV P., MALINOVA K. & GEN SU C. (1999) Breeding of bisexual lines of the silkworm, *Bombyx mori* L. with androgenetic origin. Bull. Ind. Acad. Seric., 3 (1), 36-41.
- OHKUMA T. (1971) Studies on the mechanism of hybrid vigor by means of artificial parthenogenesis in the silkworm, *Bombyx mori* L. J. Seric. Sci. Jpn., 40, 422-430.
- RAVINDRA SINGH, JAYASWAL K. P. & SARATCHANDRA B. (1994) Parthenogenetic development of ovarian eggs in some breeds of silkworm, *Bombyx mori* L. Entomon, 19 (1&2), 57-62.
- RAVINDRA SINGH, RAO D. R., KARIAPPA B. K. SANYAL P. & PREMALATHA V. (2002) Studies on parthenogenetic development, hybrid vigor and cocoon shape variability in bivoltine F₁ hybrids of the silkworm, *Bombyx mori* L. Int. J. Indust. Entomol., 5 (1), 59-65.
- RAVINDRA SINGH, RAO D. R., GANGOPADHYAY D., CHOUDHARY N., KARIAPPA B. K. & DANDIN S. B. (2004) Development of a polyvoltine breed- BL₆₇ (Pg) of the silkworm, *Bombyx mori* L. with parthenogenetic origin. Int. J. Indust. Entomol., 9 (1), 41-46.
- SHINBO H., KITAZAWA T., IMANASHI S., KIGUCHI K. & MURAKAMI A. (1991) Preservation method of genetic stocks of the silkworm (*Bombyx mori*): conditions of ovary freezing, thawing and parthenogenetic activation. Bull. Natl. Inst. Seric. Ent. Sci., 2, 47-63.
- STRUNNIKOV V. A. (1986) Nature of heterosis and combining ability in the silkworm. Theor. Appl. Genet., 72 (5), 503-512.
- TAKEI R., NAKAGAKI M., KODAIRA R. & NAGASHIMA E. (1990) Factor analysis on the parthenogenetic development of ovarian eggs in the silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). Appl. Entomol. Zool., 25 (1), 43-48.
- YONGQIANG W., MENGKUI X., ZHIQI M., KERONG H., JINRU C. & XIULING H. (2004) Genetic analysis of asexual reproductive character in silkworm, *Bombyx mori* L. Canye Kexue, 30 (2), 133-136.

DEVELOPPEMENT PARTHENOGENETIQUE CHEZ DES ŒUFS EXCISES D'HYBRIDES F1 DU VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

DEBNIRMALYA GANGOPADHYAY & RAVINDRA SINGH

Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore -570 008, India.

*Dans cette étude, nous avons tenté d'induire une parthénogenèse artificielle chez des œufs excisés non fécondés de différents hybrides F1 de lignées bivoltines, bivoltines et polyvoltines et polyvoltines du ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* L. Les hybrides bivoltins présentent un taux plus élevé de parthénogenèse par comparaison aux hybrides bivoltins × polyvoltins et polyvoltins. Tous les individus parthénogénétiques sont exclusivement femelles.*

INTRODUCTION

Dans le lignage du ver à soie, la parthénogenèse artificielle revêt une importance particulière pour obtenir des hybrides à la viabilité, l'hétérosis, la capacité de combinaison élevées et des populations uniformes sur le plan phénotypique (Strunnikov, 1986 ; Takei et coll., 1990). On a récemment analysé les effets génétiques sur les caractères parthénogénétiques du ver à soie (Yongqiang et coll., 2004). On a aussi utilisé la parthénogenèse artificielle pour améliorer la gestion de la population transformée dans une application de routine de la technologie de la transgènes chez *B. mori* (Grenier et coll., 2004). Plusieurs tentatives ont été réalisées par de nombreux chercheurs pour induire la parthénogenèse artificielle chez le ver à soie, *Bombyx mori* L. (Astaurov, 1940, 1967 ; Takei et coll., 1990 Hirokawa, 1990 ; Ravindra Singh et coll., 1994 ; 2004). On a rapporté le mécanisme de la vigueur hybride par la parthénogenèse artificielle (Ohkuma, 1971). On observe la vigueur hybride à un degré plus important chez l'hybride F1 de lignées homozygotes (Nacheva et coll., 1999). On dispose de peu d'information sur le développement parthénogénétique des lignées / hybrides de vers à soie présents en Inde. Nous avons donc entrepris cette étude.

MATERIELS ET METHODES

Dans cette étude, nous avons utilisé neuf hybrides bivoltins F1 comprenant 4 types japonais (c'est à dire NB4D2 × CSR4, CSR6 × CSR26, CSR19 × CSR4, CSR19 × CSR6) et 5 types chinois (c'est à dire CSR2 × CSR17, CSR2 × CSR27, CSR3 × CSR17, CSR17 × CSR12, CSR18 × CSR12) avec 6 hybrides F1 bivoltins × polyvoltins comprenant Cambodge, une lignée polyvoltine avec un cocon en fuseau de couleur jaune doré (c'est à dire NB4D2 × Cambodge, CSR6 × Cambodge, CSR12 × Cambodge, CSR17 × Cambodge, CSR18 × Cambodge, CSR19 × Cambodge) et 7 hybrides F1 polyvoltins (c'est à dire Nistari × Cambodge, RD1 × Cambodge, RD1 × Nistari, BL61 × BL62, BL67 × Nistari, 96A × BL67 et 96E × Cambodge). Chez chaque hybride, on recueille les œufs de 5 à 15 papillons femelles vierges en fonction de l'éclosion. On suit la méthode d'Astaurov (1967) pour induire la parthénogenèse artificielle. On extrait les œufs des ovarioles d'un papillon venant d'éclore, on les lave sous l'eau du robinet, on les sèche et on les conserve à 25° C et à 85 % d'humidité relative (R. H.) pendant 12 heures. Puis, on traite les œufs à l'eau chaude à 46° C pendant

18 minutes, on les transfère dans de l'eau à température ambiante pendant 10 minutes et finalement on les sèche et on les incube à 15° C pendant 72 heures. Chez les hybrides bivoltins, lorsque la séreuse devient marron clair, on traite les œufs avec de l'acide hydrochlorique chaud. Plus tard, on incube les œufs à 25° C et 85 % d'H. R. jusqu'à l'éclosion. On identifie le développement parthénogénétique des œufs avec l'apparition d'une pigmentation brique foncé dans les cellules de la séreuse. Le ratio d'œufs pigmentés brique foncé sur le nombre total d'œufs traités exprime le pourcentage de parthénogenèse.

On enregistre les données concernant le nombre d'œufs pigmentés, le nombre d'œufs non pigmentés, le nombre total d'œufs traités, le % de parthénogenèse et le % d'éclosion.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'induction comparative de la parthénogenèse artificielle chez les œufs excisés non fécondés des différents hybrides F₁ bivoltins, bivoltins × polyvoltins et polyvoltins est présentée dans le Tableau I. Les hybrides bivoltins de type japonais présentent un développement parthénogénétique plus prononcé. CSR₁₉ × CSR₆ présente le pourcentage maximum de développement parthénogénétique (91,20 %) suivi par CSR₁₉ × CSR₄ (88,56 %). On enregistre le % d'éclosion maximum chez CSR₁₉ × CSR₄ (78,13 %) suivi par CSR₁₉ × CSR₆ (51,05 %) et CSR₆ × CSR₂₆ (47,78 %). Parmi les hybrides bivoltins de type chinois, on observe le pourcentage maximum de développement parthénogénétique chez CSR₁₈ × CSR₁₂ (78,99 %) suivi par CSR₃ × CSR₁₇ (60,34 %) et CSR₁₇ × CSR₁₂ (57,97 %) tandis que le % d'éclosion est maximum chez CSR₂ × CSR₂₇ (6,78 %) suivi par CSR₂ × CSR₁₇ (2,72 %). On observe le pourcentage maximum de développement parthénogénétique chez CSR₆ × Cambodge (69,08 %) suivi par CSR₁₇ × Cambodge (67,20 %), cependant le % d'éclosion chez ces hybrides n'est pas satisfaisant. Le % d'éclosion est plus élevé chez CSR₁₉ × Cambodge (20,68 %) tandis qu'il est relativement plus faible chez CSR₁₈ × Cambodge (6,35 %). Parmi les 7 hybrides polyvoltins, on enregistre un % plus élevé pour le développement parthénogénétique chez RD₁ × Nistari (73,10 %), RD₁ × Cambodge (72,94 %), BL₆₁ × BL₆₂ (56,87 %), Nistari × Cambodge (54,15 %) et BL₆₇ × Nistari (50,12 %) tandis qu'on n'observe pas d'éclosion. Les deux hybrides 96A × BL₆₇ et 96^E × Cambodge qui montrent une mauvaise performance pour le développement parthénogénétique (respectivement 34,34 % et 38,90 %) présentent une éclosion inférieure de respectivement 1,23 % à 2,68 %.

Dans cette étude, on a identifié certains hybrides potentiels c'est à dire CSR₁₉ × CSR₄, CSR₁₉ × CSR₆, CSR₆ × CSR₂₆, CSR₁₉ × Cambodge, CSR₂ × CSR₂₇ et CSR₁₈ × Cambodge en raison de leur meilleure réponse envers la parthénogenèse artificielle. On observe une variation très importante concernant le développement parthénogénétique et l'éclosion des œufs excisés non fécondés chez les différents hybrides bivoltins, bivoltins × polyvoltins et les hybrides polyvoltins. Le développement parthénogénétique chez les lignées / hybrides de vers à soie a déjà été présenté (Hirokawa, 1990 ; Ravindra Singh et coll., 1994, 2002). Les données de cette étude révèlent clairement que les hybrides bivoltins de type japonais sont plus enclins à la parthénogenèse. Les résultats confirment ceux de Ravindra Singh et coll., (1994). Shinbo et coll., (1991) ont observé des différences considérables selon les souches dans la capacité parthénogénétique chez les lignées de vers à soie.

IMPACT OF HELIUM-NEON LASER ON BIO-COMMERCIAL TRAITS OF SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

S. R. HOSAGOUDAR & H. B. MANJUNATHA*

Department of Sericulture, Karnatak University, Dharwad 580 003, Karnataka, India.

*Exposure of silkworm, **Bombyx mori** (NB4D2) eggs to He-Ne laser at 632.8 of 1mW, for longer duration resulted in reduced larval weight up to 21%. The male and female cocoon weight, shell weight, shell ratio was also reduced to the extent of 11, 12, 20, 24, 12 and 13% respectively. The total number of eggs and laid eggs was declined of about 28 and 39% respectively. Surprisingly 11% of hatching was increased in the batch irradiated for 25 minutes group over control. Thus it is obvious that He-Ne laser has effect on silkworm embryo.*

Keywords: *Bombyx mori*, He-Ne laser, irradiation, cocoon, traits, fecundity.

INTRODUCTION

The attention on silkworm, *Bombyx mori* lavished par excellence for the various studies. In recent years, it has been recognized as a molecular model insect although most of the efforts on the silkworm were channeled towards improvement of silk production due to its economic value. Several attempts also made to determine various genetic and non-genetic effects of ionizing and non-ionizing radiation (Tazima, 1978) on silkworm and to evolve better strain for increased silk production. Besides biological effects of magnetic energy (Chougale & More, 1992), neutrons (Murakami & Kondo, 1964), ultrasound (Surendranath *et al.*, 1995), cosmic rays (Morimoto *et al.*, 2000) and heavy ion (Kotani *et al.*, 2002) on silkworm eggs were analyzed. Recently lasers are finding widespread applications in the field of medicine. Lasers were successfully employed for ultra precise surgery, various photo-therapeutic modalities and biomedical diagnostic applications (Gupta and Bhawalkar, 1999). Information of laser studies on silkworm is scanty except the works of Kanarev and Chan (1985), Myohora (1994 & 1995) and Jin *et al.*, (2001). Thus present study was undertaken to analyze the effect of Helium-Neon (He-Ne) laser on silkworm embryo and economic traits.

MATERIALS & METHODS

The well-acclimatized bivoltine race NB4D2 was considered as the experimental animal in the present study. Eggs of 2-day old were exposed to Helium-Neon laser of 632.8 nm of red visible light, 1 mW at the distance of 15 cm for 15, 20 and 25 min. Each exposure consists of 8 to 9 eggs in a batch for a replication and 10 replications were maintained for each treatment and in control. The irradiated eggs along with control batch were incubated under optimum environmental conditions ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ and $75 \pm 5\%$ relative humidity) and on hatching, all silkworm larvae were reared separately in three replications under optimum environmental conditions (Jolly, 1987). The percent of hatching was determined based on number of larvae hatched out of irradiated eggs in each replication. Full grown

* Correspondance- manjunathahb@yahoo.com.

larval weight, cocoon weight, shell weight and shell ratio were recorded from randomly selected five larvae and cocoons from each replication. Total number of eggs formed, number of laid eggs and laid egg percentage was recorded from randomly selected five moths in each replication. All the data were subjected to ANOVA analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, we have employed Helium-Neon laser on silkworm *Bombyx mori* embryo for the first time to determine its biological effectiveness. Here, although we have not observed any morphological variations as induced by UV laser (Hosagoudar, 2005), but the percentage of hatching was significantly increased to 98.04% in 25 minutes irradiated batch compare to control of 85.11% (Table I).

Table I. Effect of He-Ne laser radiation on biological traits of *Bombyx mori*.

Tableau I. Effet de l'irradiation au laser He-Ne sur les caractères biologiques de Bombyx mori.

Age of embryo for irradiation	Irradiation (Minutes)	Hatching	Larval weight (g)	Cocooning (%)	Fecundity		
					Total No. of eggs	Laid no. of eggs	Laid egg percentage
Age de l'embryon pour l'irradiation		Eclosion (%)	Poids larvaire (g)	Filage du cocon (%)	Fécondité		
					Nbre total d'oeufs	Nbre d'œufs pondus	(%) d'œufs pondus
Control / Témoin		87.90 ± 0.7	3.883 ± 0.1	87.50 ± 1.0	424.00 ± 1.0	388.40 ± 1.8	91.38 ± 1.6
	15	89.18 ± 0.7 (101)	3.783 ± 0.1 (97)	75.16 ± 0.6 (85)	400.40 ± 1.1 (94)	287.60* ± 0.9 (74)	77.51 ± 2.2 (84)
48 hours 48 heures	20	96.16* ± 1.3 (109)	3.227* ± 0.6 (83)	73.68 ± 0.6 (84)	369.00* ± 2.3 (77)	275.40* ± 1.1 (70)	67.52* ± 1.7 (73)
	25	98.18* ± 0.8 (111)	3.100* ± 0.3 (79)	70.00 ± 0.6 (80)	332.80* ± 2.6 (72)	237.80* ± 1.3 (61)	66.81* ± 1.5 (72)

* Significant at 0.05 level / *Significatif au seuil de 0,05*. Percent change over control in parentheses / % de changement par rapport au témoin entre parenthèses.

** Significant at 0.01 level / *Significatif au seuil de 0,01*. ± S D: Standard Deviation / *Ecart type*.

Table II. Effect of He-Ne laser radiation on cocoon traits of *Bombyx mori*.Tableau II. Effet de l'irradiation au laser He-Ne sur les caractères du cocon de *Bombyx mori*.

Age of embryo for irradiation	Irradiation duration (Minutes)	Male			Female		
		Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Shell ratio (%)	Cocoon weight (g)	Shell weight (g)	Shell ratio (%)
		Mâle			Femelle		
Age de l'embryon pour l'irradiation	Durée de l'irradiation (Minutes)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (g)	Richesse soyeuse (%)
Control / Témoin		1.420 ± 0.1	0.335 ± 0.03	23.57 ± 1.3	1.864 ± 0.1	0.348 ± 0.01	18.68 ± 0.6
48 hours 48 heures	15	1.349* ± 0.04 (95)	0.307 ± 0.02 (91)	22.79 ± 0.8 (96)	1.740 ± 0.03 (93)	0.322* ± 0.02 (92)	18.54 ± 1.6 (99)
	20	1.301* ± 0.1 (91)	0.270* ± 0.03 (80)	20.96* ± 1.1 (88)	1.682 ± 0.1 (90)	0.267* ± 0.02 (76)	16.12* ± 0.5 (86)
	25	1.271* ± 0.02 (89)	0.269* ± 0.03 (80)	20.71* ± 2.4 (88)	1.657 ± 0.03 (88)	0.335 ± 0.01 (96)	16.35* ± 0.5 (87)

* Significant at 0.05 level / *Significatif au seuil de 0,05*. Percentage over control in parentheses / *Pourcentage par rapport au témoin entre parenthèses*.

** Significant at 0.01 level / *Significatif au seuil de 0,01*. ± SD: Standard Deviation / *Ecart type*.

This increased percent of hatching might be due to stimulation on the respiratory electron process through changes in redox state of respiratory components as production of ATP, which is a source of cellular energy, is linked to enhanced metabolism as opinioned by Gupta and Bhawalkar (1999). But the larval weight was significantly decreased of about 21% (maximum) in 25 minutes irradiated batch compared to control. Subsequently, cocooning percentage was also decreased considerably to the extent of 20% (25 minutes irradiated group, Table I). Male and female cocoon weight, shell weight was 1.271, 1.657, 0.269 and 0.335 g in 25 minutes irradiated batch compare to respective controls of 1.420, 1.864, 0.335 and 0.348 g. Male and female shell ratio was also reduced significantly of 12 and 13% over respective controls (Table II). A significant decrease of fecundity recorded in 25 minutes irradiated batch was 332.80 over control (Table I). Decreased full-grown larval weight, cocoon weight, shell weight and fecundity in all the irradiated batches indicate that He-Ne laser although does not caused severe damage on silkworm embryonic cells that leads to embryonic death but might have disturbed mid gut cells, as it is one of the radiation sensitive organ as opinioned by Murakami

and Miki (1972). Concomitantly, the non degraded protein along with the other dysfunctional proteins could have been over loaded for the eggs and larvae that developed thereafter, which may have resulted in mortality (Nirmala *et al.*, 1999).

Interestingly, UV laser induced population revealed quite different results than He-Ne in which shorter duration of nanosecond UV laser irradiation induced positive effect (Published elsewhere). Whereas longer duration of nano and pico second irradiation exhibited negative effect on cocoon traits in *B. mori*. Thus positive and negative effect varies with different energy levels of He-Ne and UV laser that corresponds well to that of embryonic stage.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. B.G. Mulimani and Dr. S. R. Inamdar, Laser Spectroscopy (DRDO/KU), Department of Physics, Karnatak University, for providing UV laser unit along with technical support.

REFERENCES

- CHOUGALE A.K. & MORE N.K. (1992) Effect of magnetization on the developmental period and cocoon characters of the silkworm, *Bombyx mori* (L.). Indian J. Seric., 31 (2), 115-122.
- GUPTA P.K. & BHAWALKAR D.D. (1999) Laser application in medicine: Studies at center for advanced technology. Current Science 77 (7), 925-933.
- JIN C., CHEN F. & XU H. (2001) Research on the biological effect of mulberry wild silkworm (*Bombyx mandarina*) irradiated He-Ne laser. Acta Laser Biology Sinica 10 (2), 23.
- JOLLY M.S. (1987) Appropriate sericulture techniques. pp:63-106. International Center for Training and Research in Tropical Sericulture, CSR&TI, Mysore, India.
- HOSAGOUDAR S.R. (2005) Effect of laser radiation on silkworm *Bombyx mori* L. Ph.D. thesis of Karnatak University, Dharwad, Karnataka, India.
- KANAREV G. & CHAN D.T. (1985) Effect of laser irradiation of silkworm eggs on the silkworm, *Bombyx mori*, development and productivity. Zhivotnov Nauki, 22, 47-53.
- KOTANI E., FURUSAWA T., NAGAOKA S., KUMIE N., FUJI H., SUGIMURA Y., ICHIDA M., SUZUKI E., NAGAMATUSU A., TODO T. & IKENAGA M. (2002) Somatic mutation in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*, induced by heavy ion irradiation to diapause eggs. J. Radiat. Res. 43 (Suppl), 193-198.
- MORIMOTO K., SAKAI Y., YAMAOKA F. & OHNISHI T. (2000) The effect of cosmic radiation on silkworm eggs. Bulletin of Nara University of Education, Natural Sciences. 49 (2), 9-14.
- MURAKAMI A. & KONDO S. (1964) Relative biological effectiveness of 14 MeV neutron to gamma rays for inducing mutations in silkworm gonads. Japan J. Genetics. 39, 102-114.
- MURAKAMI A. & MIKI M. (1972) Age dependent changes of radiosensitivity in embryo of *B. mori*. J. Radiat. Res. 13, 182-192.
- MYOHARA M. (1994) Fate mapping of the silkworm, *Bombyx mori*, using localized UV irradiation of the egg at fertilization. Development, 120 (10), 2869-2877.
- MYOHARA M. (2003) Fate mapping of the larval silk glands of, *Bombyx mori*, by UV irradiation of the egg at fertilization. Dev. Genes Evol. 213, 178-181.
- NIRMALA X., VANISHREE V. & KRISHNAN M. (1999) Changes in embryonic protein profile and economic characters of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) following UV irradiation. Indian J. Experi. Biol. 37, 560-566.
- SURENDRA NATH B., MAHENDRA VARMA B., VIJAYA PRAKASH N.B. & SURENDRA KUMAR R.P. (1995) Effect of ultrasound on the developmental period and economic characters of the silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 35 (3), 571-573.
- TAZIMA Y. (1978) In: The Silkworm: an Important Laboratory Tool, (Ed. by Tazima Y), Kodansha Ltd., Tokyo.

IMPACT DU LASER HELIUM-NEON SUR LES CARACTERISTIQUES BIO-COMMERCIALES DU VER A SOIE, *BOMBYX MORI* L.

S. R. HOSAGOUDAR & H. B. MANJUNATHA*

Department of Sericulture, Karnatak University, Dharwad 580 003, Karnataka, Inde.

*L'exposition des œufs du ver à soie **Bombyx mori** (NB4D2) au laser He-Ne de 632,8 à 1mW, pendant une durée assez longue entraîne la diminution du poids larvaire de 21 %. Le poids du cocon mâle et femelle, le poids de la coque, la richesse soyeuse diminuent aussi de l'ordre de respectivement 11, 12, 20, 24, 12 et 13 %. Le nombre total d'œufs et d'œufs pondus diminue d'environ respectivement 28 et 39 %. De manière surprenante, on observe une augmentation du taux d'éclosion de 11 % chez le lot irradié pendant 25 minutes par rapport au témoin. Il est donc évident que le laser He-Ne a un effet sur l'embryon du ver à soie.*

INTRODUCTION

On accorde beaucoup d'attention au ver à soie, *Bombyx mori* L dans des études variées. Récemment, on l'a reconnu comme insecte modèle sur le plan moléculaire bien que la plupart des efforts aient été dirigés vers l'amélioration de la production de soie compte tenu de sa valeur économique. On a aussi réalisé plusieurs tentatives pour déterminer les effets génétiques et non-génétiques variés du rayonnement ionisant et non ionisant (Tazima, 1978) chez le ver à soie afin de mettre au point une meilleure souche pour augmenter la production de soie. Par ailleurs, on a analysé les effets biologiques de l'énergie magnétique (Chougale et More, 1992), des neutrons (Murakami et Kondo, 1964), des ultrasons (Surendranath et coll., 1995), des rayons cosmiques (Morimoto et coll., 2000) et des ions lourds (Kotani et coll., 2002) chez les œufs de vers à soie. Depuis quelques temps, les lasers trouvent des applications étendues dans le domaine de la médecine. Les lasers ont été employés avec succès dans la chirurgie d'ultra précision, pour des modalités photo-thérapeutiques variées et des applications de diagnostic biomédical (Gupta et Bhawalkar, 1985). Les études sur le laser chez le ver à soie sont rares à l'exception des travaux de Kanarev et Chan (1985) Myohora (1994 et 1995) et Jin et coll., (2001). Nous avons donc entrepris cette étude pour analyser l'effet du laser Helium-Neon (He-Ne) sur l'embryon de ver à soie et sur ses caractères économiques.

MATERIELS ET METHODES

Dans cette étude, on considère la race bivoltine bien acclimatée NB4D2 comme l'animal expérimental. On expose les œufs de 2 jours au laser Helium-Neon de 632,8 nm de lumière rouge visible, à 1mW à une distance de 15cm pendant 15, 20 et 25 minutes. Chaque exposition concerne un lot de 8 à 9 œufs pour une répétition et on maintient 10 répétitions pour chaque traitement et pour le témoin. On incube les œufs irradiés ainsi que le lot témoin dans des conditions environnementales

* Correspondance – manjunathabb@yahoo.com

optimums ($25 \pm 1^\circ \text{C}$ et avec une humidité relative de $75 \pm 5\%$) et à l'éclosion, on élève toutes les larves de vers à soie séparément en trois répétitions dans les meilleures conditions environnementales (Jolly, 1987). On détermine le pourcentage d'éclosion en fonction du nombre de larves ayant éclos à partir des œufs irradiés pour chaque répétition. On enregistre le poids de la larve à maturité, le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse de cinq larves et cocons sélectionnés au hasard pour chaque répétition. On enregistre le nombre total d'œufs qui se sont formés, le nombre d'œufs pondus et le pourcentage d'œufs pondus chez cinq papillons sélectionnés au hasard pour chaque répétition. On soumet toutes les données à l'analyse ANOVA.

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons employé pour la première fois le laser Helium – Neon chez l'embryon du ver à soie *Bombyx mori* pour déterminer son efficacité biologique. Ici, nous n'avons pas observé de variations morphologiques comme celles induites par le laser UV (Hosagoudar, 2005) mais le pourcentage d'éclosion augmente de manière significative jusqu'à 98,04 % chez le lot irradié pendant 25 minutes par comparaison au témoin (85,11 %) (Tableau I).

Cette augmentation du pourcentage d'éclosion pourrait être due à la stimulation du processus des électrons pendant la respiration par les changements de l'état d'oxydoréduction des composants respiratoires telle que la production d'ATP, qui est une source d'énergie cellulaire et est liée à l'amélioration du métabolisme comme l'ont suggéré Gupta et Bhawalkar (1999). Mais le poids larvaire diminue de manière significative d'environ 21 % (au maximum) chez le lot irradié pendant 25 minutes par rapport au témoin. Par la suite, le pourcentage de filage du cocon diminue aussi considérablement de l'ordre de 20 % (groupe irradié pendant 25 minutes, Tableau I). Le poids du cocon mâle et le poids du cocon femelle, le poids de la coque sont de 1,271 ; 1,657 ; 0,269 et 0,335 g chez le lot irradié pendant 25 minutes par comparaison à respectivement 1,420 ; 1,864 ; 0,335 et 0,348 g chez les témoins. La richesse soyeuse mâle et femelle diminue aussi de manière considérable de 12 et 13 % par rapport aux témoins respectifs (Tableau II). On enregistre une diminution considérable de la fécondité (332,80) chez le lot irradié pendant 25 minutes par rapport au témoin (Tableau II). La baisse du poids larvaire adulte, du poids du cocon, du poids de la coque et de la fécondité chez tous les lots irradiés montre que le laser He-Ne bien qu'il ne cause pas de dégâts importants pour les cellules embryonnaires du ver à soie entraînant la mort de l'embryon, pourrait avoir perturbé les cellules de l'intestin moyen, puisque c'est l'un des organes sensibles au rayonnement selon l'avis de Murakami et Miki (1972). De manière concomitante, les protéines non dégradées et les autres protéines dysfonctionnelles pourraient avoir été en surcharge chez les œufs et les larves qui se développent après, ce qui pourrait avoir entraîné la mortalité (Nirmala et coll., 1999).

De manière intéressante, la population induite par les lasers UV révèle des résultats assez différents par rapport au He-Ne avec lesquels, une durée plus courte en nanosecondes d'irradiation aux lasers UV induit un effet positif (données publiées ailleurs). Tandis qu'une durée plus longue d'irradiation pendant des nano et des pico secondes a un effet négatif sur les caractères du cocon chez *B. mori*. L'effet positif et négatif varie donc avec les différents niveaux d'énergie des lasers He-Ne et UV.

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.

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.

