

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

Mini-revue / Mini-review

- Mulberry root rot and its management 361**
 Gestion de la pourriture de la racine chez le mûrier en Inde 373
 K. A. MURUGESH, C. A. MAHALINGAM, S. MANIMEGALAI & S. SUBRAMANIAN

Articles scientifiques / Scientific papers

- Studies on transfer of disease resistant genes non-susceptible to densovirus type 1 (BmDNV1) into productive silkworm breeds 383**
 Etude sur le transfert de gènes de résistance au virus de la densovirose de type 1 (BmDNV1) chez des lignées de vers à soie productives 393
 P. SUDHAKARA RAO, B. NATARAJU, M. BALAVENKATASUBBAIAH & S. B. DANDIN

- New microsporidia causing infection in silkworm, *Bombyx mori* L. 397**
 Nouvelles microsporidies entraînant une infestation chez le ver à soie *Bombyx mori* L. . . 407
 A. G. K. DANIEL, R. N. SINGH, S. S. SINDAGI & C. K. KAMBLE

Rapports techniques / Technical reports

- Genetic identification of economic characters in Iranian native silkworm group . . . 411**
 Identification génétique des caractères économiques dans des populations de vers à soie originaires d'Iran 419
 M. MAVVAJPOUR, S. Z. MIRHOSSEINI & M. GHANIPOUR

- Crop stabilization in muga culture 423**
 Stabilisation des récoltes dans l'élevage du muga 433
 A. BARAH, D. MECH, U. HAZARIKA & R. CHAKRAVORTY

- Seasonal variation and percentage frequency of soil mycoflora of *Morus alba* L. from Dharwad 437**
 Variation saisonnière et fréquence de la mycoflore du sol de *Morus alba* L. à Dharwad . . 453
 Ch. RAMESH & B. P. KABBALAGERI

- Formulation of medium to reduce the cost of *in vitro* micropropagation of mulberry 459**
 Formulation d'un milieu permettant la diminution du coût de la micromultiplication du mûrier *in vitro* 467
 R. KAVYASHREE, M. C. GAYATRI & H. M. REVANASIDDIAH

Note brève / Brief note

Intensity of powdery mildew disease caused by <i>Phyllactinia corylea</i> in mulberry and its management	471
Intensité de la maladie du mildiou poudreux provoquée par <i>Phyllactinia corylea</i> chez le mûrier et mesures de lutte	475
S. MANIMEGALAI, N. CHANDRAMOHAN & C. A. MAHALINGAM	

MULBERRY ROOT ROT AND ITS MANAGEMENT

K. A. MURUGESH, C.A. MAHALINGAM, S. MANIMEGALAI & S. SUBRAMANIAN

Department of Sericulture, Centre for Plant Protection Studies, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore – 641 003, India.

Mulberry (Morus alba L.), a commercially important crop which is raised for its nutritious leaves required for production of silk cocoon, is currently encountering in southern India, a serious problem due to rampant incidence of root rot disease caused by various soil-borne pathogens resulting into excessive damage as also reduction in acreage. Mulberry genotype, adopted agronomic practices, prevalence of pathogens, biotic and abiotic factors greatly influence the occurrence of the disease. The disease incidence is widely observed in all major sericulture tracts of India and it is consistently on increase. Thus, the disease is posing a great threat to the very existence of mulberry plantations endangering the sericulture industry. Hence, the factors favouring disease, associated pathogens, their role and management strategies are discussed.

Keywords: Mulberry root rot, *Macrophomina*, *Fusarium*, varietal reaction, nematode-fungal complex, management.

Mulberry (*Morus alba* L.) is one of the most important commercial crops grown extensively as food plant for the silkworm, *Bombyx mori* L. In India, mulberry is cultivated in 0.216 million hectares under different agroclimatic conditions varying from temperate to tropical ones which makes the plant vulnerable to various types of diseases. Twenty diseases have been reported so far in mulberry caused by fungi, bacteria, viruses, mycoplasma and nematodes. The diseases cause 5 to 10 per cent loss in leaf yield due to defoliation and an additional loss of 20 to 25 per cent by deterioration in leaf quality (Sukumar and Padma, 1999).

Mulberry being a perennial crop, soil borne diseases are more prevalent in this cultivation and are a serious constraint for the production of quality leaf for feeding silkworm. The problem is observed both in nursery and established fields (Philip *et al.*, 1995b). Among the diseases, root rot caused by soil borne fungi i. e., *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. and *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. is more alarming due to the epidemic nature of pathogens, its potential to kill the plant and moreover lack of effective control measures against this disease (Vineet *et al.*, 1998). The first occurrence of root rot in mulberry caused by *M. phaseolina* and *Ganoderma lucidum* (Leyss) Karst. was recorded in India by Butler and Bisby (1960).

Keeping in view the extent of loss due to root rot disease which causes economic instability to the sericulture farmers, this review is made in order to pool all the published information which lie scattered for arriving a collective idea on this topic. This information shall throw more light on pathogens associated with root rot, their role and their management which will help the sericulture researchers.

Disease incidence and yield loss:

The disease incidence due to fungi in mulberry varies with season, variety and cultivation practices. Gangwar and Thangavelu (1991) conducted a survey covering 973 fields in 22 taluks (= taluk is typically part of a district and typically contains villages) of Tamil Nadu and observed an average incidence of 5.7 per cent. The highest incidence of 33.30 per cent was recorded in Kundadam taluk of Erode district followed by 14.30 per cent in Mettupalayam taluk of Coimbatore district and

the least incidence of 0.01 per cent was recorded in Denkanikottai taluk of Dharmapuri district. A survey on the incidence of root rot disease showed its wide spread occurrence in almost all mulberry growing areas of Kerala, besides its prevalence in Karnataka and Andra Pradesh (Philip *et al.*, 1992).

The death of mulberry plants due to the root rot disease ranged from 2 to 30 per cent in Chamarajanagar district of Karnataka, Madanpalle and Chittoor of Andhra Pradesh and Hosur, Nagercoil and Salem districts of Tamil Nadu (Anonymous, 1992; Chandrashekar and Rajadurai, 1999; Sharma, 1999). Philip *et al.* (1995a) conducted a survey covering 86 mulberry fields in states of Southern India and found that 48 per cent of the plantations were affected by root rot.

Philip *et al.* (1995b) recorded varying intensity of disease from 3 to 30 per cent with an average of 14 per cent in mulberry tracts of Southern India. The incidence was upto 55 per cent in some fields at Anantapur of Andhra Pradesh and Chamarajanagar of Karnataka. An entire mulberry field was found destroyed by the disease in Kerala. Rajendran (1996) reported that the extent of occurrence of the disease in three districts of Tamil Nadu *i. e.*, Tiruchirappalli, Coimbatore and Thanjavur ranged from 20 to 31 per cent. Studies made by Sharma (1999) indicated the root rot incidence in 48 per cent of mulberry field with plant mortality upto 30 per cent and he stated that it is represented as a serious problem in many sericulture areas of South India.

Sridhar (2002) made a survey on root rot in Coimbatore and Erode districts of Tamil Nadu and found that per cent disease incidence ranged from 5.6 to 83.3 per cent in mulberry variety MR2 with least mean root rot incidence of 16.1 per cent in Coimbatore as against 45.32 per cent in Erode. An over all analysis of disease dynamics for the last two decades showed increasing level of incidence in Coimbatore and Erode districts as compared to other districts. Govindaiah *et al.* (2003) documented plant mortality of 10 to 20 per cent in disease prone areas of Karnataka. Qadri and Dhahira Beevi (2005) conducted a survey on the mulberry fields of Villupuram, Coimbatore, Erode, Salem and Dharmapuri districts of Tamil Nadu and found that the root rot disease incidence ranged from 0.05 per cent to 80 per cent.

Disease etiology:

The factors attributed to the occurrence of disease are the mulberry genotype, method of cultivation, intercultural operations, edaphic factors and environmental factors like temperature, humidity and rainfall. Many of soil borne diseases including root rot are stress-related and they are observed under tropical and subtropical climatic conditions, where the crop is exposed to the environmental stress that predisposes the crop to the infection.

Weeds are considered as the carrier of many fungal spores and also help in multiplication of pathogens and root knot nematode. Hence, weed control should be an integral part of disease control in mulberry (Govindaiah *et al.*, 1989). Philip *et al.* (1992) reported that the root rot incidence was severe in high rainfall areas in Wynad and Tamil Nadu.

The disease is favoured by high temperature of soil, low soil moisture and increased soil salinity. Light textured loam and sandy loam soils favour the spread of disease more rapidly than clay and silt loam. Similarly, humidity provides the favourable conditions for growth and sporulation of many soil-borne fungal pathogens (Govindaiah *et al.*, 2003). Qadri and Dhahira Beevi (2005) reported that certain factors *i. e.*, soil type, planting material from infected plantations, low organic matter content, imbalanced agronomical inputs, water stress condition, alternate showers and heat spells may act as predisposing factors for this disease outbreak.

Causal organisms and symptoms:

The root rot is caused by many fungal pathogens (Table I) and the symptoms of the disease in mulberry vary depending on the nature of the pathogen causing root rot. In *Sclerotium rolfsii* Sacc. root rot, the collar portion of sprouted cuttings was sunken and covered with white mycelial mat and large number of brown coloured ellipsoidal sclerotial bodies (Siddaramaiah and Hedge, 1984). The infection was confined to the basal portion of the stem. On opening the infected stem, brown colour

mycelium could be seen along the vascular region emitting rotten smell. At advanced stages, the leaves fell down at slight touch and the plant wilts completely (Dhahira Beevi and Qadri, 2003).

Table I. Pathogens causing root rot disease during different years.

Tableau I. Pathogènes provoquant la maladie du pourrissement de la racine.

S. No.	Year	Pathogen(s)	Author	Place
No. de série	Année	Pathogène(s)	Auteur	Endroit
1.	1984	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Siddaramaiah & Patil	Dharwad
2.	1988	<i>Fusarium oxysporum</i> & <i>F. solani</i> .	Siddaramaiah & Hedge	Dharwad
3.	1989	<i>Helicobasidium mompa</i> & <i>Rosellinia necatrix</i>	Gangwar & Thangavelu	Dharmapuri, Salem & Erode
4.	1992	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Anonymous <i>Anonyme</i>	Mysore
5.	2000	<i>Fusarium moniliforme</i> & <i>F. semiseptum</i>	Sridhar	Erode

In the root rot caused by *F. solani* and *F. oxysporum* Schlecht, the above ground plant parts showed yellowing, drooping and defoliation in isolated patches in the field (Siddaramaiah and Hedge, 1988; Philip *et al.*, 1995b). *F. solani* produced elongated, slightly sunken brown lesions on collar region and on the roots just below the crown leading to withering of plants. Later, pinkish spore mass were seen on the dried cuttings. The symptoms also appear on the buds and leaves, first in the form of small water soaked spots, which later turn brown in colour, leading to blighting of the growing buds and leaves (Siddaramaiah and Hedge, 1988). The pathogen damaged the fine feeder roots followed by rapid decay of main root system leaving the stump (Govindaiah *et al.*, 2003). The infected plants show withering and defoliation of the branch from bottom upwards. Rotting of bark and cortex of both primary and secondary roots. The cortex below the bark turns gummy, paste like and gets peeled off easily. The leaf show withering symptom after decay of most of the roots and subsequently the plant die (Philip *et al.*, 2004).

In the root rot caused by *M. phaseolina*, sudden withering of leaves and total decaying of primary and secondary root barks appeared in isolated patches in a field. The affected plant failed to sprout after pruning and got dried up completely (Anonymous, 1992). The diseased plants exhibited yellowing and drooping of the leaves which subsequently dropped off. Brown lesions were seen on the stem at ground level with shredded bark. The affected plants could be easily pulled out leaving dried, rotten root portions in the ground. The rotten tissues of stem and the root contained large number of black sclerotia (Prakasam *et al.*, 1993).

In the violet root rot caused by *Helicobasidium mompa* Naka., the leaves became smaller accompanied by early defoliation, decaying of most of the roots and subsequent death of affected trees (Ito, 1941; Spaulding, 1961). Discolouration and formation of lignin like material were observed

after the fungus passed through the cork tissue and cambium. As the disease advanced, the rotting spread to the xylem tissues also (Ieki, 1973). Sudden withering of leaves and collapse of plants occurred during rainy seasons. The epidermal tissues of the larger and smaller roots were seen covered with whitish violet coloured mycelial mat (Rangaswamy *et al.*, 1976; Mandal *et al.*, 1992).

White root rot fungus, *Rosellinia necatrix* (Hartig) Berl. passed through the cork tissue dissolving the cell wall of young mulberry roots that had poorly developed secondary tissues. It rarely penetrated between the cork cells. When adult mulberry roots with advanced secondary tissues were infected, it invaded the inner tissues mainly through the lenticels (Sakurai, 1952). The diseased mulberry plants became weak, the leaf buds grew feebly, leaves withered off and the plant died very soon. The stump region showed whitish grey mycelial mat (Sengupta *et al.*, 1990).

Epidemiology:

The germination of the basidiospores of *H. mompa* occurred within a few hours even in distilled water at a temperature range of 17-35°C (Ito, 1941). The fungus was also found to live as a saprophyte on plant debris in soil and infected slender roots (Ito, 1941; Spaulding, 1961). *M. phaseolina* survived on plant residues in the field, and also in the soil, during summer in the form of sclerotia (Jain and Kulkarni, 1965). *R. necatrix* grew well at an average temperature of 24°C, but reduced growth was also seen at 8°C and 30°C. The most luxuriant growth of this fungus was observed at 17.5°C (Sefsum and Nakayama, 1966).

Free sclerotia survived upto 30 days at all temperature and moisture regimes in field soil (Banerjee *et al.*, 1983). *M. phaseolina* infected the crop mainly under dry warm conditions. Mukherjee and Banerjee (1986) found that sclerotial production was stimulated by low soil moisture with ten per cent moisture holding capacity. The disease incidence was maximum at 35°C and 76 per cent relative humidity (Patel and Patel, 1990). The optimum pH for the growth of the pathogen was 7.0 (Ratnoo and Bhatnagar, 1991). *Fusarium* can live saprophytically in the soil for a period of 5 to 6 years. It can withstand widely varying adverse conditions, including pH range of 4-9 and soil temperature as high as 35°C (Govindaiah *et al.*, 2003).

Nematode-fungal complex:

Root knot nematode is one of the limiting factors in mulberry production in sandy soils. Root knot nematode - fungal complex has been reported from almost all mulberry-cultivating areas in India. The root knot disease is known to cause reduction in mulberry leaf yield to the tune of 10-12 per cent (Govindaiah, 1990). Besides their direct damage, the root knot nematodes are also involved in causing disease complex with fungi by providing favourable site for easy entry of developing hyphae of *Rhizoctonia bataticola* resulting in increased severity of the disease (Mishra *et al.*, 1988).

Bhagyarathy *et al.* (1999) reported that not only the root knot nematode and fungus complex did increase the disease incidence, but also significantly reduced the biometric parameters of mulberry *i.e.*, shoot height (39.93 cm) and root length (17.98 cm) compared to the control (58.87 and 24.90 cm, respectively). The different species of *Fusarium* invade the plant roots through wounds caused by the mechanical injuries and damages caused by nematode (Govindaiah *et al.*, 2003).

Nishitha Naik *et al.* (2004) recorded increased root rot incidence (75.34 %) and lower shoot (12.50 cm) and root lengths (9.00 cm) when the mulberry was infected with root knot nematode and *F. solani* complex compared to the mulberry infected with *F. solani* alone (42.76 %, 39.00 and 15.00 cm, respectively). They also observed that root knot nematode caused wounds in roots that make the plant more susceptible to the attack of soil borne pathogens and cause disease complex in plants.

Varietal reaction:

The safest method to check this disease is the use of disease resistant varieties. Identification of suitable mulberry genotypes with resistance to soil pathogens is a long drawn process, though it is

ecologically safer and brings out permanence of disease control. Availability of root rot pathogens resistant genotypes in *Morus alba*, *M. indica*, *M. latifolia* and *M. serrata* needs documentation at laboratory and field level. Several workers reported differential reaction of mulberry genotypes against root rot pathogens. Mulberry cultivars, S36 and S34 showed lesser susceptibility to root rot pathogens than M5 and MR2 (Gangwar and Thangavelu, 1991).

In Andhra Pradesh, Karnataka and Kerala states of India, 'Local' mulberry cultivar showed resistance reaction to root rot disease (Anonymous, 1992). Almost all popular mulberry cultivars like K2, Local, S54, S34, MR2, S 13 and S36 cultivated in South India were affected by the root rot disease caused by *F. solani* (Gupta and Govindaiah, 1993). On the contrary, Philip *et al.* (1995a) documented higher susceptibility of S34 (55.55 %) followed by S13 (53.45 %) than Local variety (19.44 %).

Higher susceptibility of MR2 to *M. phaseolina* in Erode district (80 %) was observed by Sridhar (2002). Eight mulberry genotypes raised in Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore were evaluated for their field reaction to root rot caused by *M. phaseolina*. Per cent damage ranged from 13.43 to 93.36. Among the genotypes, S708 recorded minimum damage of 13.43 per cent as against 93.36 per cent in S30. Extensively cultivated mulberry genotype V1 registered 86.73 per cent damage (Chandramohan, 2005).

Gangadhara (2005) standardized the technique for large scale *in vitro* screening of mulberry plant against root rot pathogen, *M. phaseolina* by adding phaseolin toxin to MS medium. He proved higher resistance reaction of genotype S708 by recording increased plant survivability of 55.5 per cent followed by MR2 (33.3 %) than V1 (16.6 %) at 4 per cent concentration.

Though differential reaction was noticed among mulberry genotypes against root rot, development of resistant varieties through breeding programme has limited value due to prolonged time needed to develop a variety. This can be overcome by *in vitro* selection of mulberry genotypes against soil borne pathogens.

MANAGEMENT PRACTICES

Cultural methods:

Cultural methods always ensure field sanitation thereby preventing the introduction of inoculum into field and also reduce or eliminate inoculum from diseased field. Hot water disinfection of mulberry sapling infected by *R. necatrix* and isolation ditch for preventing the development of the disease was reported to be effective (Matuo and Sakurai, 1954). Even though there are no reports on the cultural management of root rot on mulberry caused by *Rhizoctonia* sp., there are many reports for other annual crops.

Many diseases can be checked or at least the intensity can be reduced by following appropriate cultural practices like suitable spacing, proper weeding, use of disease free cuttings, field sanitation and timely harvest of leaf (Govindaiah, 1990). Uprooting of the affected mulberry stumps and roots and burning them as soon as the disease symptoms appeared was found effective in checking the spread of root rot caused by *H. mompa*. Ploughing the soil and sun drying were recommended for effective management of this disease (Sengupta *et al.*, 1990).

In areas where the incidence by *F. solani* was suspected, ploughing the land deep in summer and exposure of soil to sunlight was recommended (Philip *et al.*, 1995b). Soil borne pathogen such as *F. solani* and *Meloidogyne incognita* causing root rot and root knot in mulberry spread through farm instruments and hence care has to be taken by washing the instruments before and after use for preventing the introduction of these diseases in healthy fields. Two or three deep ploughing with a soil turner in summer month expose the nematodes and infected tissues in soil to solar heat and cause dehydration. This will help in suppression of soil pathogenic fungi such as *Fusarium* (Philip, 1997).

Good hygienic condition, sanitation at field, application of more quantity of organic manures such as Farm Yard Manure (FYM), compost, green manure, intercropping of various crops such as beans, sesame and sorghum, and flooding are found to reduce the incidence of root rot. Crop rotation

may also help to slow down the build up of inoculum of root rot pathogens and prevent them from reaching destructive level (Govindaiah *et al.*, 2003).

Chemical methods:

The most common means of control of mulberry diseases in India is the use of chemical compounds that are toxic to the pathogens. These chemicals either inhibit germination, growth and multiplication of pathogens or they are outrightly lethal to them. In India, various fungicides are used for the control of root rot diseases which provide direct protection to root surface from infection or eradicate the pathogens that have already infected the plant.

For the management of white root rot of mulberry caused by *R. necatrix*, chloropicrin at 37.8 g per square metre was tested in three different soils and it was found that on fine textured soil, the performance of chloropicrin was poorer in filled soil than in unfilled soil (Kubomura *et al.*, 1970). Washing of mulberry saplings before planting with 20 per cent lime water, one per cent copper sulphate or 0.1 per cent sublimate for one hour, followed by thorough washing with water reduced the root rot disease (Anonymous, 1975).

Disinfection of soil with chloropicrin (450 g/ sq. m) or calcium cyanamide (2400 g/ sq. m) and soil fumigation with 1 per cent formaldehyde also proved effective (Rangaswamy *et al.*, 1976). Soil drenching with bavistin, brassicol and captan were found to be more effective against wilt caused by *S. rolfii* (Siddaramaiah and Hedge, 1984).

More effective control of *F. solani* and *F. oxysporum* was obtained by dipping the root system of mulberry saplings in the solution of bavistin (0.2 %) for one hour, followed by planting in pits dusted with 3-4 g of Dithane M 45. In established plantations, soil drenching with bordeaux mixture was recommended (Philip and Govindaiah, 1993; Philip *et al.*, 1995b). Soil drenching at the base of plant with 1 per cent bordeaux mixture or 0.2 per cent bavistin solution will be effective if the disease is identified in the initial stage when plant show leaf withering (Philip, 1997).

Dipping the roots of sapling in 0.1 per cent bavistin solution for half an hour and planting in the pit dusted with 3-4 g Dithane M 45 ensured 88 per cent protection against the root rot incidence (Sharma, 1999). Ravikumar *et al.* (2004) evaluated nine fungicides against mulberry wilt caused by *Fusarium* spp. in the laboratory and found that ridomil, rolco, captan and blitox at 0.2 per cent concentration inhibited the fungal growth to the extent of 91.31, 89.86, 84.74 and 80.39 per cent, respectively. Evaluation of the same chemicals in the field showed that application of carbendazim (0.2 %) + copper oxychloride (0.3 %) twice at an interval of 15 days or benomyl (0.1 %) + copper oxychloride (0.3 %) and proficanzole (0.1 %) + copper oxychloride (0.3 %) twice at an interval of 15-20 days was found effective in the management of wilt.

Though the chemical control of root rot disease is the most common and widely accepted because it is more effective, the chemicals have to be applied at appropriate time in suitable concentration. Further, a suitable time span has also to be found out before using the leaves for silkworm feeding. Wrong use of the chemicals may even result in further aggravating the problem.

Biological methods:

Excessive dependence on chemicals to combat diseases has resulted in ecological imbalance, threatening the ecosystems. Root rot being a soil-borne disease, not only will the use of chemicals be costly but also will lead to atmospheric pollution, development of resistance by the pathogens, destruction of beneficial microorganisms and disruption of biological equilibrium in soil. In recent years global awareness on pesticide toxicity problems has encouraged scientists to develop methods to protect the environment by taking help of beneficial microbes and biological products to control the plant diseases. The biological agents control the disease by producing toxic substances against pathogenic fungi and also by competing for nutrients and space with pathogen in the soil and rhizosphere. Hence, the concept of biological control is gaining momentum.

Philip *et al.* (1995) developed a biofungicide with *Trichoderma harzianum* for root rot management. They recorded 75 per cent disease reduction over the check when *T. harzianum* and FYM mixture (1:50) was applied in the amount of 500g in the pit (1m³) before planting and at an interval of six months subsequently.

Rajendran (1996) reported that the application of *T. viride* and *T. harzianum* significantly reduced the root rot incidence to 2.80 per cent from 30.60 per cent in control. The disease started appearing only from 75 days after pruning (DAP) in the *Trichoderma* applied plants while in the control, it started from 30 DAP. He also reported that the application of neem (*Azadirachta indica*), pongam (*Pongamia pinnata*) and castor (*Ricinus communis*) cakes in the doses of 1000 kg/ha effectively reduced the root rot incidence of mulberry to 22.20, 33.30 and 33.30 per cent, respectively from 55.60 per cent in the control and the combined application of *T. viride*-6 along with biofertilizer, *Azospirillum* or *Azotobacter* at a concentration of 20 kg/ha significantly reduced the root rot incidence. The radial mycelial growth of *F. solani* and *F. oxysporum* was inhibited upto 76.9 and 85.7 per cent respectively by 20 per cent neem cake extract, while the neem leaf extract inhibited the mycelial growth by 83.4 and 84.1 per cent respectively. At same concentration, karanj (*Pongamia pinnata*) leaf extract has inhibited the radial mycelial growth of *F. solani* and *F. oxysporum* to 50.8 and 42.9 per cent respectively, while karanj cake extract inhibited the mycelial growth of *F. solani* and *F. oxysporum* up to 59.1 and 60.6 per cent respectively (Philip and Sharma, 1997).

Sridhar *et al.* (2000) studied the effect of different antagonistic agents against the fungus, *M. phaseolina* isolated from mulberry roots and found that *Bacillus subtilis*, *T. viride* and *Pseudomonas fluorescens* at 25 g/plant reduced the growth of pathogen by 66.7, 55.6 and 33.3 per cent respectively over the control. Screening of various isolates of *Pseudomonas fluorescens* isolated from the rhizosphere regions of mulberry against root rot pathogens showed that the isolates, *Psf*-1 and *Psf*-2 were effective against *F. solani*, *F. oxysporum* and *Botryodiplodia theobromae* (Govindaiah *et al.*, 2001).

The biological control may become a viable part of integrated disease management systems for soil-borne diseases. In order to apply bioagents for biological control, not only must one learn how the biological equilibrium in the soil can be modified to become detrimental to pathogen survival and its activity but also have a thorough understanding of the mycoparasite-pathogen interaction and its relation to disease development.

Integrated Disease Management:

The disease control measures based on a single component are not very much effective and the use of chemical measures is known to have a number of undesirable effects on soil health as above-mentioned. So that integrated disease management practices involving use of different control measures is need of the hour.

Dipping the root system of mulberry saplings in the solution of 0.1 per cent Dithane M 45 (Mancozeb 75 % WP) for 30 minutes before planting and application of *Trichoderma harzianum* at 500g/plant around the roots in at least 2-3 surrounding rows of infected plants after removing the soil to a depth of 5-6 inches (Sharma, 1999), may be one of the measure.

Cutting and burning affected portions of the plants, soil application of 0.2 per cent carbendazim or captan in the uprooted area after loosening the soil, root dipping of saplings in 0.2 per cent carbendazim solution for 30 minutes, spraying on cut ends and stumps with 0.2 per cent carbendazim and broadcasting of carbendazim or captan at 3.2 kg/ha followed by irrigation (Sukumar *et al.*, 1999). On-farm trials of Integrated Disease Management involving Raksha (*T. harzianum*) and Dithane M45 (0.1%) were conducted in hot spot areas of South India. The technology provided 53.5 to 77.9 per cent disease control at Regional Sericultural Research Station farms, 57.4 to 77.2 per cent at farmers' field and 73.9 per cent at Central Sericulture Research and Training Institute, Mysore over control (Gupta *et al.*, 2000).

Another tested methodology was avoiding hot spot areas, removal of diseased and dead plants and burning them, followed by drenching the soil around the plants with 0.25 per cent copper oxychloride (COC) repeatedly at an interval of 10-15 days (Dhahira Beevi and Qadri, 2003). Furthermore, uprooting of the severely affected plants and destroying them. Soil is dug out to a depth of one foot and allowed for drying. Later, dust 5-10 g Dithane M45/ pit and plant the new sapling and apply 5-10 g Dithane M45/ plant to the surrounding plants near the diseased plants. Subsequently, after one month apply Raksha (*T. harzianum*) and FYM mixture (1:50) at 500 g/ plant, at an interval of three months (Govindaiah *et al.*, 2003).

Removal and burning of the affected plants, soil drenching with 0.1 per cent carbendazim, application of *Bacillus subtilis* and *T. viride* along with FYM (1:1:1) at 25g/ plant, 30 days after drenching and neem cake at 1.0 tonne/ ha in four split doses (Anonymous, 2005).

Present status of root rot in Tamil Nadu:

Large scale occurrence of mulberry root rot in Tamil Nadu necessitated us to take up a reconnaissance on the disease. A survey involving scientists from Department of Sericulture and Plant Pathology of Tamil Nadu Agricultural University (Coimbatore) and extension personal from State Department of Sericulture (Tamil Nadu) was taken up during 2005 in Western zone of Tamil Nadu. Purposive sampling in affected fields indicated the following information for consolidation of our research programme for future direction.

- Maximum root rot incidence in Udumalpet division was 33.3 per cent and in Coimbatore was 6.5 per cent.
- *M. phaseolina* was the predominant pathogen in summer (70.83 %). Mixed infection of *M. phaseolina* and *Fusarium* spp. was seen during rainy and winter seasons (20.83 %).
- Age of the crop, previous crops, crops surrounding the existing mulberry crop, irrigation method, soil type, method of planting and spacing did not influence the disease prevalence. Disease was prevalent under all the different conditions.
- Nutrient management influenced the disease incidence.
- Integrated management had given rich dividend than relying on simple component of disease management.

Future research strategies:

- ⇒ Documentation of bio-diversity of pathogens involved in traditional sericultural areas.
- ⇒ Estimating the actual yield loss in terms of leaf and cocoon by systematic surveys in all major mulberry growing areas.
- ⇒ Suitable warning system should be developed to facilitate the farmers to take precautionary measures against disease outbreak.
- ⇒ Screening programme of high yielding and ruling mulberry varieties be immediately taken up under hot-spots identified in different parts in order to enable identification of a tolerant mulberry varieties.
- ⇒ Standardisation of the fungicides application techniques for pathogen and mixed pathogens.
- ⇒ Exploring the role of consortia of potential antagonistic fungi and bacterial organisms to develop cheap and environmental friendly disease management strategies.
- ⇒ Identifying newer molecules by evaluation of newer fungicides.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1975) Text book of Tropical Sericulture. Japan Overseas Cooperation Volunteers, 4-2-24 Hiro, Sibuya-Ku, Toyko, Japan. p 594.

- ANONYMOUS (1992) Root rot: New menace in Mulberry. Central Sericultural Research and Training Institute News, 2(1):1.
- ANONYMOUS (2005) Diseases and nematodes of mulberry and their damage. Manual on Sericulture Technology, Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, p.28.
- BANERJEE S., MUKHERJEE B., SEN C. (1983) Survival of mycelia and sclerotia of *Macrophomina phaseolina* in soil. Influence of moisture and temperature. Indian J. Plant Pathol., 1:20-23.
- BHAGYARATHY N., SIDDAPPAJI M. A., SHANKAR M. A., CHINNASWAMY K.P., SHRIKANT CHAVAN (1999) Interaction of root knot nematode *Meloidogyne incognita* and fungus *Rhizoctonia bataticola* on mulberry plants. Proceedings of National Seminar on Tropical Sericulture : 152-153.
- BUTLER E.J., BISBY G.R. (1960) The Fungi of India, Vasudeva. (Eds.) Indian Council Agric. Res, New Delhi. p. 552.
- CHANDRAMOHAN N. (2005) A conspectus of mulberry root rot in Coimbatore district. Proceeding of "Brainstorming Session on Mulberry Root rot". Department of Sericulture, Centre for Plant Protection Studies, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, 9th August, p.23.
- CHANDRASHEKAR D.S., RAJADURAI S. (1999) Sericulture in Tamil Nadu: MR2 and disease management needs. Indian silk, 20(2):8-10.
- DHAHIRA BEEVI N., QADRI S.M.H. (2003) Mulberry stem rot in Tamil Nadu. Indian Silk, 42(6):15.
- GANGADHARA S. (2005) Studies on micropropagation of mulberry and *in vitro* screening for resistance to root rot (*Macrophomina phaseolina* Tassi.). M.Sc. (Seri.) Thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore. p 82.
- GANGWAR S. K., THANGAVELU K. (1991) Occurrence of mulberry diseases in Tamil Nadu. Indian Phytopath., 44:545-549
- GOVINDAIAH (1990) Studies on root knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting mulberry. Ph.D. Thesis, University of Mysore, p. 81.
- GOVINDAIAH, DANDIN S. B., MADHAVA RAO Y.R. (1989) Host range of *Meloidogyne incognita* causing root knot disease in mulberry (*Morus alba* L.), Indian J. Seric., 28(1):121-126.
- GOVINDAIAH, SHARMA D. D., CHOWDARY N.B. (2003) Management of root rot disease in mulberry. Indian Silk, 42(6):13-15.
- GOVINDAIAH, SHARMA D. D., SARASWATHY R., REDDY M. B. (2001) Effectiveness of *Pseudomonas fluorescens* for the control of root rot disease in mulberry. Annual Report (2000 - 01), Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, p.18.
- GUPTA V.P., GOVINDAIAH (1993) Management of fungal diseases associated with mulberry nurseries. Annual report (1993-94), Central Sericultural Research & Training Institute, Mysore : 18.
- GUPTA V.P., SHARMA D. D., SRIKANTASWAMY K., MOHAN RAM RAO D., MOHAN DAS T.P., MUTHULAKSHMI K, CHINNADURAI V. (2000) On-farm trials of IPM technologies for the control of nursery and root rot diseases. Annual Report 1999-2000. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore : 42-44.
- IEKI H. (1973) Study on the infection of mulberry root with *Helicobasidium mompa* Tanaka. J. Seric. Sci. Jpn., 42(3):193-198.
- ITO K. (1941) Studies on the Murasaki mompa disease caused by *Helicobasidium mompa* Tanaka. Bull. Seric. Expt. Stn. (Tokyo), p.43.
- JAIN S.C., KULKARNI S.N. (1965) Root and stem rot of sesame. Indian Oil Seeds J., 9:201-203.
- KUBOMURA Y., LEKI H., ITOI S. (1970) Soil disinfection with chloropicrin against white root rot fungus *Rosellina necatrix*. Bull. Seric. Expt. Stn., 24(2):287-302.
- MANDAL S. K., BISWAS S., TEOTIA R. S. (1992) Management of root rot diseases of mulberry. Indian Silk, 42(5):42-45.
- MATUO T., SAKURAI Y. (1954) Hot water disinfection of the sapling infected by *Rosellina necatrix*. J. Seric. Sci., Tokyo, 23: 271 -277.
- MISHRA C., SOM D., SINGH B. (1988) Interaction of *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia bataticola* in white jute. Indian J. Agric. Sci., 58(3):234 -235.

- MUKHERJEE B., BANERJEE S. (1986) Influence of soil pH, temperature and moisture on the ability of mycelia of *Macrophomina phaseolina* to produce sclerotia in soil. Indian Phytopath., 36: 158-160.
- NISHITHA NAIK V., SHARMA D. D., GOVINDAIAH, CHOWDARY N.B. (2004) Occurrence of root knot disease complex in mulberry due to nematode and fungal association. Proceeding of Progress of Research on Disease and Pest Management in Sericulture : 29-35.
- PATEL K.K., PATEL A.J. (1990) Meteorological correlation of charcoal rot. Indian J. Mycol. Plant Pathol., 20: 64-65.
- PHILIP T. (1997) Mulberry diseases : Prevention is better than control. Indian Silk, 36 (2): 14-16.
- PHILIP T., GOVINDAIAH (1993) Mulberry disease control. A pre-requisite for successful sericulture. Indian Silk, 32 (5): 15-18.
- PHILIP T., SHARMA D. D. (1997) *In vitro* evaluation of leaf and oil cake extracts of *Azadirachta indica* and *Pongamia glabra* on mulberry root rot pathogens. Indian J. Seric., 36 (2): 150-152.
- PHILIP T., LATHA J., GOVINDAIAH (1992) Studies on root rot disease of mulberry and their control by chemical and biological methods. Annual Report, CSR&TI, Mysore (1992-93). p.32-33.
- PHILIP T., MARY JOSEPHA A. V., QADRI S.M.H. (2004) Root rot of mulberry. Sci. Tech., The Hindu, Feb 19, p.14
- PHILIP T., SHARMA D. D., GOVINDAIAH (1995a) Root rot disease of mulberry and its control by chemical and biological methods. Annual Report 1995. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, p.64.
- PHILIP T., SHARMA D. D., GOVINDAIAH. (1997) Fungal and bacterial association with root rot of mulberry. Indian J. Seric., 36(1): 27-29.
- PHILIP T., SHARMA D. D., GOVINDAIAH, BAJPAI A.K., DATTA R.K. (1995b) Root rot disease of mulberry and its management. Indian Farming, May 1995: 23-24.
- PHILIP T., LATHA J., GOVINDAIAH, MALLIKARJUNA B., MANDAL K. C., BAJPAI A.K. (1995c) Some observations on the incidence, associated microflora and control of root rot disease of mulberry in South India. Indian J. Seric, 34(2): 137-139.
- PRAKASAM V., VALLUVAPARIDASAN V., JEYARAJAN R. (1993) A Handbook on Field Crop Diseases. A. E. Publications, Coimbatore. p.68-75.
- QADRI S.M.H., DHAHIRA BEEVI N. (2005) An experience with root rot of mulberry in Tamil Nadu. Proceeding of "Brainstorming Session on Mulberry Root Rot". Department of Sericulture, Centre for Plant Protection Studies, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, 9th August 2005, p.7-9.
- RAJENDRAN K.S. (1996) Studies on biological control of root rot of mulberry (*Morus alba* L.) caused by *Rhizoctonia bataticola* (Taub) But. M.Sc. (Sericulture) Thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore. p 94.
- RANGASWAMI G., NARASIMHANNA M.N. KASIVISWANATHAN K., SASTRY C.R., JOLLY M. S. (1976) Manuals on Sericulture Vol. I Mulberry cultivation, FAO Pub., Rome.
- RATNOO R. S., BHATNAGAR M. K.. (1991) Effect of temperature and pH on growth and sclerotia formation. Indian J. Mycol. Pl. Path., 21:279- 280.
- RAVIKUMAR M. R., CHANDRASEKAR S, SHAMARAO JAHAGIRDAR, BALIKAI R. A., PRAKASH, PAWAR K.N. (2004) Mulberry diseases in Northern Karnataka and their management. Proceeding of Progress of research on disease and pest management in sericulture - 2004. (Ed. Govindan, Ramakrishna Naika and Sannappa). p.7-9.
- SAKURAI Y. (1952) Pathological anatomical observations on the white root rot of mulberry, by *Rosellina necatrix* (Hort) Res. Rep. Fac. Text. of Seri. Shinshu Univ. 2: 18-26.
- SEFSUMN G., NAKAYAMA K. (1966) Difference in the temperature requirements of *Rosellina necatrix* isolates. Bull. Seric. Expt. Stn., 20: 323-331
- SENGUPTA K., PRADEEP K., MUTHUZA B., GOVINDAIAH (1990) Handbook on Pest and Disease control of Mulberry and Silkworm. Economic and Social Commission for South Asian pacific, United Nations, Thailand. p.3.
- SHARMA D.D. (1999) Management of root rot disease. Indian Silk, 37(11): 11 - 12.

- SIDDARAMAIAH A. L., HEGDE R.K. (1988) A new root rot, bud and leaf blight of mulberry seedlings from India. Indian J. Seric., 27(2) : 161.
- SIDDARAMAIAH A. L., PATIL R.R. (1984) New wilt disease of sprouted cuttings of mulberry in the nursery from India. Indian J. Seric., 23(46): 46.
- SPAULDING, P. (1961) Foreign diseases of forest trees of the world. Agri. Handbook, U.S. Dept. Agric., p.361.
- SRIDHAR R. (2002) Annual Report of Department of Sericulture, Centre for Plant Protection Studies, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, p. 8.
- SRIDHAR R., SUBRAMANIAN A., CHANDRAMOHAN N. (2000). Management of root rot with antagonistic microorganisms. Sericologia 40 (3) : 383 -386.
- SUKUMAR J., PADMA S.D. (1999) Disease of mulberry in India – Research progress and priorities. In : Advances in Mulberry Sericulture (Ed. Devaiah, M.C., Narayanaswamy, K. C. and Maribashetty, V.G), C.V.G. Publications, Bangalore, p.152-186.
- SUKUMAR J., PADMA S.D., PRASAD K. V., NAGENDRA KUMAR TD (1999) Studies on *Lasiodiplodia* root rot disease. Annual Report 1998-1999. Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, p 33-34.
- VINEET K., SHARMA D.D., BABU A.M., DATTA R.K. (1998) SEM studies on the hyphal interactions between a biocontrol agent *Trichoderma harzianum* and a mycopathogen *Fusarium solani* causing root rot disease in mulberry. Indian J. Seric., 37(1): 17-20.

GESTION DE LA POURRITURE DE LA RACINE CHEZ LE MURIER EN INDE

K. A. MURUGESH, C. A. MAHALINGAM, S. MANIMEGALAI & S. SUBRAMANIAN

Department of Sericulture, Centre for Plant Protection Studies, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore – 641 003, Inde.

*Le mûrier (*Morus alba* L.), une culture commercialement importante pour ses feuilles nutritives nécessaires à la production du cocon de soie rencontre en ce moment dans le sud de l'Inde, des problèmes importants à cause de l'incidence de la maladie de la pourriture de la racine provoquée par divers pathogènes contenus dans le sol, qui entraînent des dégâts excessifs ainsi qu'une diminution de la surface cultivée. Le génotype de mûrier, les pratiques agronomiques adoptées, la présence de pathogènes, les facteurs biotiques et abiotiques influencent beaucoup la présence de la maladie. On observe une incidence importante de la maladie dans toutes les zones de l'Inde et elle augmente régulièrement. La maladie représente donc une menace importante pour l'existence même des plantations de mûrier, et met en danger l'industrie séricicole. Nous avons donc étudié les facteurs qui favorisent la maladie, les pathogènes qui lui sont associés, leur rôle et les stratégies de lutte.*

Le mûrier (*Morus alba* L.) est l'une des principales cultures commerciales, largement cultivée comme plante nourricière du ver à soie, *Bombyx mori* L. En Inde, le mûrier est cultivé sur 0,216 millions d'hectares dans des conditions agroclimatiques allant de tempérées à tropicales, qui rendent les plantes vulnérables à différents types de maladies. On a rapporté vingt maladies jusqu'à présent chez le mûrier, provoquées par des champignons, des bactéries, des virus, des mycoplasmes et des nématodes. Les maladies entraînent 5 à 10 % de pertes en rendement foliaire à cause de la défoliation et une perte supplémentaire de 20 à 25 % à cause de la détérioration de la qualité de la feuille (Sukumar et Padma, 1999).

Le mûrier étant une culture vivace, les maladies véhiculées par le sol sont plus répandues chez cette culture et elles représentent une contrainte importante pour la production de feuilles de qualité pour nourrir le ver à soie. On observe le problème à la fois dans les pépinières et dans les muraies établies (Philip et coll., 1995b). Parmi les maladies, la pourriture de la racine provoquée par les champignons véhiculés par le sol, c'est à dire *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. et *Fusarium solani* (mart.) Sacc., est la plus alarmante en raison de la nature épidémique des pathogènes, de son potentiel à tuer la plante et également à cause du manque de mesures de lutte efficaces contre cette maladie (Vineet et coll., 1998). Butler et Bisby (1960) ont enregistré pour la première fois la présence de la pourriture de la racine chez le mûrier, provoquée par *M. phaseolina* et *Ganoderma lucidum* (Leyss) Karst en Inde.

Compte tenu de l'étendue des pertes provoquées par la maladie de la pourriture de la racine et de l'instabilité économique qu'elle entraîne pour les fermiers séricicoles, nous avons réalisé cette revue pour regrouper toutes les informations publiées éparpillées et pour obtenir une vue d'ensemble sur ce sujet. Ces informations permettent de mieux connaître les pathogènes associés à la pourriture de la racine et leur rôle ainsi que les moyens de lutter contre eux et apporteront une aide aux chercheurs dans le domaine de la sériculture.

Incidence de la maladie et perte de rendement :

L'incidence de la maladie due aux champignons chez le mûrier varie en fonction de la saison, de la variété et des pratiques culturales. Gangwar et Thangavelu (1991) ont réalisé une étude regroupant 973 muraies dans 22 taluks (un taluk fait typiquement partie d'une région et contient plusieurs villages) du Tamil Nadu et ont observé une incidence moyenne de 5,7 %. On enregistre l'incidence la plus élevée de 33 % dans le taluk de Kundadam de la zone d'Erode, suivie par 14,30 % dans le taluk de Mettupalayam de la zone de Coimbatore et on enregistre l'incidence la plus faible de 0,01 % dans le taluk de Denkanikottai de la zone de Dharmapuri. Une étude sur l'incidence de la maladie de la pourriture de la racine montre qu'elle est très répandue dans la plupart des zones qui cultivent le mûrier au Kerala, et qu'elle est également courante dans le Karnataka et dans l'Andra Pradesh (Philip et coll., 1992).

La mortalité des plants de mûrier provoquée par la maladie de la pourriture de la racine est comprise entre 2 et 30 % dans la zone de Chamarajanagar dans le Karnataka, dans les zones de Madanpalle et de Chittoor de l'Andhra Pradesh et dans les zones d'Hosur, de Nagercoil et de Salem dans le Tamil Nadu (Anonyme, 1992 ; Chandrashekar et Rajadurai, 1999 ; Sharma, 1999). Philip et coll., (1995a) ont réalisé une étude sur 86 muraies dans les états du sud de l'Inde et constaté que 48 % des plantations sont affectées par la pourriture de la racine.

Philip et coll., (1995b) ont enregistré une intensité variée de la maladie de 3 à 30 % avec une moyenne de 14 % dans les zones de culture de mûrier du sud de l'Inde. L'incidence va jusqu'à 55 % dans certaines muraies à Anantapur dans l'Andhra Pradesh et à Chamarajanagar dans le Karnataka. On a trouvé une muraille entière décimée par la maladie dans le Kerala. Rajendran (1996) a rapporté que le degré de présence de la maladie dans trois zones du Tamil Nadu, c'est à dire Tiruchirappalli, Coimbatore et Thanjavur est compris entre 20 et 31 %. Les études réalisées par Sharma (1999) témoignent d'une incidence de la pourriture du mûrier de 48 % dans une muraille avec une mortalité des plantes allant jusqu'à 30 % et il a constaté qu'elle représente un problème important dans de nombreuses zones séricicoles du sud de l'Inde.

Sridhar (2002) a réalisé une étude sur la pourriture de la racine dans les zones de Coimbatore et d'Erode au Tamil Nadu et constaté que l'incidence de la maladie est comprise entre 5,6 et 83,3 % chez la variété de mûrier MR2, avec l'incidence moyenne la plus faible de pourriture de la racine de 16,1 % à Coimbatore contre 45,32 % à Erode. Une analyse générale de la dynamique de la maladie pendant les deux dernières décennies montre une augmentation du niveau d'incidence dans les zones de Coimbatore et d'Erode par comparaison aux autres zones. Govindaiah et coll., (2003) ont constaté une mortalité des plantes de 10 à 20 % dans les zones sujettes à la maladie au Karnataka. Qadri et Dhahira Beevi (2005) ont réalisé une étude sur les muraies dans les zones de Villupuram, Coimbatore, Erode, Salem et Dharmapuri du Tamil Nadu et constaté que l'incidence de la maladie de la pourriture de la racine est comprise entre 0,05 et 80 %.

Etiologie de la maladie :

Les facteurs que l'on attribue au déclenchement de la maladie sont le génotype de mûrier, la méthode de culture, les opérations interculturelles, les facteurs édaphiques et les facteurs environnementaux comme la température, l'humidité et les précipitations. La plupart des maladies véhiculées par le sol y compris la pourriture de la racine sont liées au stress et on les observe dans des conditions climatiques tropicales et subtropicales, où la culture est exposée à un stress environnemental qui prédispose la culture à l'infestation.

On considère les mauvaises herbes comme le vecteur de nombreuses spores fongiques et elles contribuent aussi à la multiplication des pathogènes et du nématode de la galle des racines. La lutte contre les mauvaises herbes devrait donc être une partie intégrante de la lutte contre les maladies chez le mûrier (Govindaiah et coll., 1989). Philip et coll., (1992) ont rapporté que l'incidence de la pourriture de la racine est importante dans les zones avec des précipitations élevées à Wynad et dans le Tamil Nadu.

La maladie est favorisée par la température élevée du sol, la faible humidité du sol et l'augmentation de la salinité du sol. Les sols de terreau à texture légère et de terreau sablonneux favorisent la propagation de la maladie plus rapidement que le terreau argileux et limoneux. De même, l'humidité apporte les conditions favorables pour la croissance et la sporulation de nombreux pathogènes fongiques véhiculés par le sol (Govindaiah et coll., 2003). Qadri et Dhahira Beevi (2005) ont rapporté que certains facteurs, comme le type de sol, le matériel (servant à la plantation) provenant de plantations infestées, la faible teneur en matière organique, des apports agronomiques déséquilibrés, les conditions de stress hydrique, les alternances d'averses et de vagues de chaleur agissent comme des facteurs qui prédisposent à l'éruption de cette maladie.

Organismes responsables et symptômes :

La pourriture de la racine est provoquée par de nombreux pathogènes fongiques (Tableau I) et les symptômes de la maladie chez le mûrier varient en fonction de la nature du pathogène qui provoque la pourriture de la racine. Avec la pourriture de la racine *Sclerotium rolfsii* Sacc., la partie du collet des boutures ayant poussé s'affaisse et est recouverte par un tapis mycéliel blanc et par un grand nombre de corps sclérotiques ellipsoïdes marrons (Siddaramaiah et Hegde, 1984). L'infestation est confinée à la partie basale de la tige. Lorsqu'on ouvre la tige infestée, on peut voir un mycelium marron le long de la région vasculaire qui diffuse une odeur de pourriture. Aux stades avancés, les feuilles tombent lorsqu'on les touche légèrement et la plante flétrit complètement (Dhahira Beevi et Qadri, 2003).

Avec la pourriture de la racine provoquée par *F. solani* et *F. oxysporum* Schlecth, les parties de la plante au-dessus du sol présentent un jaunissement, un affaissement et une défoliation dans certains endroits isolés sur le terrain (Siddaramaiah et Hegde, 1988 ; Philip et coll., 1995b). *F. solani* produit des lésions allongées marron, légèrement affaissées sur la partie du collet et sur les racines juste en dessous de la cime conduisant à la flétrissure des plants. Plus tard, une masse de spores rosâtres apparaît sur les boutures sèches. Les symptômes apparaissent aussi sur les bourgeons et sur les feuilles, d'abord sous la forme de petites taches gorgées d'eau, qui plus tard deviennent marron, ce qui entraîne la " destruction " des bourgeons et des feuilles en croissance (Siddaramaiah et Hegde, 1988). Le pathogène abîme les fines racines d'alimentation, suivi par le pourrissement rapide du système racinaire principal et il ne reste plus que la souche (Govindaiah et coll., 2003). Les plantes infestées présentent une flétrissure et une défoliation de la branche du bas vers le haut. On observe un pourrissement de l'écorce et du cortex à la fois chez les racines primaires et secondaires. Le cortex en dessous de l'écorce devient caoutchouteux, comme de la colle et s'enlève facilement. Après le pourrissement de la plupart des racines, la feuille présente des symptômes de flétrissure et par la suite la plante meurt (Philip et coll., 2004).

Avec la pourriture de la racine provoquée par *M. phaseolina*, on constate la flétrissure soudaine des feuilles et le pourrissement total des écorces primaires et secondaires de la racine dans certains endroits isolés de la muraille. La plante atteinte n'arrive pas à pousser après la taille et se dessèche complètement (Anonyme, 1992). Les plantes malades présentent un jaunissement et un affaissement des feuilles qui par la suite tombent. On observe des lésions marron sur la tige au niveau du sol et l'écorce se détache en lambeaux. On peut facilement déraciner les plantes atteintes, ce qui laisse les parties desséchées et pourries des racines sur le sol. Les tissus pourris de la tige et de la racine contiennent un grand nombre de sclérotés noirs (Prakasam et coll., 1993).

Dans la pourriture violette de la racine provoquée par *Helicobasidium mompa* Naka, les feuilles rétrécissent et sont accompagnées par une défoliation précoce, ce qui fait pourrir la plupart des racines et entraîne la mort consécutive des arbres atteints (Ito, 1941 ; Spaulding, 1961). Après que le champignon soit passé par le tissu de la racine et le cambium, on observe la décoloration et la formation d'un matériau comme de la lignine. Alors que la maladie progresse, la pourriture s'étend aussi aux tissus du xylème (Ieki, 1973). Il se produit une flétrissure soudaine des feuilles et un effondrement des plantes pendant la saison des pluies. On observe que les tissus épidermiques des

racines les plus grandes et les plus petites sont recouverts par un tapis mycéliel de couleur violet pâle (Rangaswamy et coll., 1976 ; Mandal et coll., 1992).

Le champignon de la pourriture de la racine blanche *Rosellinia necatrix* (Hartig) Berl. passe par le tissu du liège et dissout la paroi cellulaire des jeunes racines de mûrier qui se sont mal développées en tissus secondaires. Il pénètre rarement entre les cellules du liège. Quand les racines du mûrier adulte avec des tissus secondaires avancés sont infestées, il envahit les tissus internes principalement par les lenticelles (Sakurai, 1952). Les plants de mûrier malades s'affaiblissent, les bourgeons de la feuille poussent peu, les feuilles flétrissent et la plante meurt très vite. La zone de la souche présente un tapis mycéliel gris pâle (Sengupta et coll., 1990).

Epidémiologie :

La germination des basidiospores de *H. mompa* se produit en quelques heures même dans de l'eau distillée, dans une fourchette de température de 17 - 35° C (Ito, 1941). On constate aussi que le champignon vit comme un saprophyte sur les débris des plantes dans le sol et infeste les racines minces (Ito, 1941 ; Spaulding, 1961). *M. phaseolina* survit sur les résidus des plantes dans la muraie et aussi dans le sol, pendant l'été sous la forme de sclérotés (Jain et Kulkarni, 1965). *R. necatrix* pousse bien à une température moyenne de 24° C mais on observe aussi une diminution de sa croissance à 8° C et 30° C. On observe la croissance la plus luxuriante de ce champignon à 17,5° C (Sefsum et Nakayama, 1966).

Les sclérotés libres survivent pendant 30 jours à tous les régimes de température et d'humidité dans le sol de la muraie (Banerjee et coll., 1983). *M. phaseolina* infeste la culture principalement dans des conditions de sécheresse et de tiédeur. Mukherjeet et Banerjee (1986) ont constaté que la production sclérotique est stimulée par une faible humidité du sol avec une capacité de rétention de l'humidité de 10 %. L'incidence de la maladie est maximum à 35° C et 76 % d'humidité relative (Patel et Patel, 1990). Le pH optimum pour la croissance du pathogène est de 7 (Ratnoo et Bhatnagar, 1991). *Fusarium* peut vivre de manière saprophytique pendant une période de 5 à 6 ans. Il peut supporter des conditions adverses très variées, y compris une fourchette de pH entre 4 et 9 et une température du sol aussi élevée que 35° C (Bovindaiah et coll., 2003).

Association Nématode – champignon :

Le nématode de la galle de la racine est l'un des facteurs limitatifs de la production de mûriers dans les sols sablonneux. On a rapporté l'association nématode - champignon de la racine dans presque toutes les zones qui cultivent le mûrier en Inde. On sait que la maladie de la galle de la racine entraîne la diminution du rendement foliaire du mûrier de l'ordre de 10 à 12 % (Govindaiah, 1990). En plus des dégâts directs qu'ils causent, les nématodes de la galle de la racine sont aussi impliqués dans l'association de la maladie avec les champignons, en apportant un site favorable à l'entrée des hyphes en développement de *Rhizoctonia bataticola*, ce qui entraîne l'augmentation de la sévérité de la maladie (Mishra et coll., 1988).

Bhagyarathy et coll., (1999) ont rapporté que non seulement l'association nématode – champignon de la racine augmente l'incidence de la maladie, mais elle diminue aussi considérablement les paramètres biométriques du mûrier, c'est à dire la hauteur de la pousse (39,93 cm) et la longueur de la racine (17,98 cm) par comparaison au témoin (respectivement 58,87 et 24,90 cm). Les différentes espèces de *Fusarium* envahissent les racines de la plante par les lésions provoquées par les blessures mécaniques et les dégâts provoqués par le nématode (Govindaiah et coll., 2003).

Nishita Naik et coll., (2004) ont enregistré l'augmentation de l'incidence de la pourriture de la racine (75,34 %) et de plus petites longueurs de pousses (12,50 cm) et de racines (9 cm) quand le mûrier est infesté par l'association nématode de la galle de la racine et *F. solani*, par comparaison au mûrier infesté seulement par *F. solani* (respectivement, 42,76 %, 39 et 15 cm). Ils ont aussi observé que le nématode de la galle de la racine entraîne des blessures dans les racines qui rendent la plante

plus sensible à l'attaque par les pathogènes véhiculés par le sol et entraînent l'association de la maladie chez les plantes.

Réaction variétale :

La méthode la plus sûre pour stopper cette maladie est l'utilisation de variétés résistantes à la maladie. L'identification de génotypes de mûriers adaptés résistant aux pathogènes du sol est un processus à long terme, bien qu'il soit plus simple sur le plan écologique et permette une lutte permanente contre la maladie. Il est nécessaire de se documenter sur l'existence de génotypes résistant aux pathogènes de la pourriture de la racine chez *Morus alba*, *M. indica*, *M. latifolia* et *M. serrata* aux niveaux du laboratoire et du terrain. Plusieurs chercheurs ont rapporté une réaction différentielle des génotypes de mûrier contre les pathogènes de la pourriture de la racine. Les cultivars de mûrier, S36 et S34 présentent une sensibilité moins importante aux pathogènes de la pourriture de la racine que M5 et MR2 (Gangwar et Thangavelu, 1991).

Dans les états de l'Andhra Pradesh, du Karnataka et du Kerala en Inde, le cultivar de mûrier "Local" présente une réaction de résistance à la maladie de la pourriture de la racine (Anonyme, 1992). Presque tous les cultivars de mûrier populaires comme K2, Local, S54, S34, MR2, S13 et S36 cultivés dans le sud de l'Inde sont affectés par la maladie de la racine provoquée par *F. solani* (Gupta et Govindaiah, 1993). Au contraire, Philip et coll., (1995a) ont constaté une sensibilité plus élevée de S34 (55,55 %) suivi par S13 (53,45 %) et 19,44 % pour la variété locale.

Sridhar a observé la sensibilité plus élevée de MR2 à *M. phaseolina* dans la zone d'Erode (80 %) (2002). On a évalué huit génotypes de mûrier cultivés à l'Université Agricole du Tamil Nadu, à Coimbatore, quant à leur réaction sur le terrain à la pourriture de la racine provoquée par *M. phaseolina*. Le pourcentage de dégâts est compris entre 13,43 et 93,36 %. Parmi les génotypes, S708 enregistre les dégâts minimums de 13,43 % contre 93,36 % chez S30. Le génotype de mûrier très cultivé V1 enregistre 86,73 % de dégâts (Chandramohan, 2005).

Gangadhara (2005) a standardisé la technique d'évaluation *in vitro* des plants de mûrier contre le pathogène de la pourriture de la racine, *M. phaseolina*, à grande échelle grâce à l'ajout de la toxine de la phaséoline au milieu MS. Il a prouvé une réaction de résistance plus élevée du génotype S708 qui enregistre un taux de survie des plantes de 55,5 %, suivi par MR2 (33,3 %) plus que V1 (16,6 %) à une concentration de 4 %.

Bien que l'on remarque une réaction différentielle des génotypes contre la pourriture de la racine, l'intérêt de la mise au point d'un programme de lignage avec des variétés résistantes est limité à cause du laps de temps assez long nécessaire pour mettre au point une variété. On peut surmonter cela par la sélection *in vitro* de génotypes de mûrier contre les pathogènes véhiculés par le sol.

MESURES DE LUTTE

Méthodes culturales :

Les méthodes culturales permettent toujours d'assainir le terrain, ce qui permet par là même d'empêcher l'introduction de l'inoculum sur le terrain et aussi de diminuer ou d'éliminer l'inoculum du terrain malade. On a rapporté que la désinfection à l'eau chaude des jeunes arbres de mûrier infestés par *R. necatrix* et un fossé d'isolation pour prévenir le développement de la maladie sont efficaces (Matuo et Sakurai, 1954). Bien qu'il n'y ait pas de rapports sur la lutte culturale contre la pourriture de la racine provoquée par *Rhizoctonia* sp. chez le mûrier, il existe de nombreux rapports chez d'autres cultures annuelles.

On peut stopper de nombreuses maladies ou du moins on peut diminuer leur intensité en suivant des pratiques culturales appropriées telles qu'un espacement adapté, un désherbage correct, l'utilisation de boutures sans maladies, l'assainissement du terrain et la récolte des feuilles au moment approprié (Govindaiah, 1990). Il s'avère efficace de déraciner les souches et les racines de mûrier atteintes et de les brûler dès que les symptômes de la maladie apparaissent, pour stopper la propagation

de la pourriture de la racine provoquée par *H. mompa*. On recommande de labourer le sol et de le sécher au soleil pour lutter efficacement contre cette maladie (Sengupta et coll., 1990).

Dans les zones où l'on suspecte l'incidence de *F. solani*, on recommande de labourer la terre assez profondément en été et d'exposer le sol à la lumière du soleil (Philip et coll., 1995b). Les pathogènes véhiculés par le sol tels que *F. solani* et *Meloidogyne incognita*, responsables de la pourriture de la racine et de la galle de la racine chez le mûrier se propagent par les instruments de travail et il faut donc faire attention à laver les instruments avant et après leur utilisation pour prévenir l'introduction de ces maladies sur les terrains sains. Deux ou trois labours profonds en retournant le sol en été, exposent les nématodes et les tissus infestés du sol à la chaleur solaire et entraînent la déshydratation. Cela contribue à supprimer les champignons pathogènes du sol tels que *Fusarium* (Philip, 1997).

On constate que de bonnes conditions d'hygiène, l'assainissement du terrain, l'application d'une plus grande quantité d'engrais biologiques tels que le fumier de ferme (FYM), le compost, les engrais verts, les diverses cultures intercalées comme les haricots, le sésame et le sorgho et l'inondation diminuent l'incidence de la pourriture de la racine. La rotation des cultures peut aussi aider à ralentir l'accumulation des pathogènes de la pourriture de la racine et les empêcher d'atteindre un niveau destructeur (Govindaiah et coll., 2003).

Méthodes chimiques :

Les moyens de lutte les plus courants contre les maladies du mûrier en Inde sont l'utilisation de composés chimiques qui sont toxiques pour les pathogènes. Ces produits chimiques inhibent la germination, la croissance et la multiplication des pathogènes ou leur sont carrément fatals. En Inde, on utilise plusieurs fongicides pour lutter contre les maladies de la pourriture de la racine ; ils apportent une protection directe à la surface de racine contre l'infestation ou suppriment les pathogènes qui ont déjà infesté la plante.

Pour lutter contre la pourriture blanche de la racine de mûrier provoquée par *R. necatrix*, on a testé la chloropicrine à 37,8g par mètre carré dans trois sols différents et l'on a constaté que sur du sol à texture fine, la performance de la chloropicrine est moins bonne dans du sol tassé que dans du sol non tassé (Kubomura et coll., 1970). Lorsqu'on lave les jeunes plants de mûrier avec 20 % d'eau chaulée, un % de sulfate de cuivre ou 0,1 % de sublimat pendant une heure avant de les planter, puis qu'on les lave soigneusement avec de l'eau, cela diminue la maladie de la pourriture de la racine (Anonyme, 1975).

La désinfection du sol avec de la chloropicrine (450 g / m²) ou du cyanamide (2400 g / m²) et la fumigation du sol avec 1 % de formaldéhyde s'avère aussi efficace (Rangaswamy et coll., 1976). L'administration de bavistine, de brassicol et de captan dans le sol s'avère plus efficace contre la flétrissure provoquée par *S. rolfsii* (Siddaramaiah et Hegde, 1984).

On lutte plus efficacement contre *F. solani* et *F. oxysporum* en trempant le système racinaire des jeunes plants de mûrier dans une solution de bavistine (0,2 %) pendant une heure, et en les plantant ensuite dans des trous saupoudrés avec 3 - 4 g de Dithane M 45. Dans les plantations établies, on a recommandé l'administration de bouillie bordelaise dans le sol (Philip et Govindaiah, 1993 ; Philip et coll., 1995b). Le traitement du sol avec 1 % de bouillie bordelaise à la base de la plante ou avec 0,2 % de solution de bavistine s'avère efficace si on identifie la maladie au stade initial quand la plante présente une flétrissure de la feuille (Philip, 1997).

Si l'on trempe les racines du jeune plant dans une solution de bavistine à 0,1 % pendant une demi-heure et qu'on le plante dans un trou saupoudré avec 3-4 g de Dithane M45, cela assure 88 % de protection contre l'incidence de la pourriture de la racine (Sharma, 1999). Ravikumar et coll., (2004) ont évalué neuf fongicides contre la flétrissure du mûrier provoquée par *Fusarium* spp. en laboratoire et constaté que le ridomil, le rolco, le captan et le blitox à une concentration de 0,2 % inhibent la croissance fongique respectivement de 91,31 ; 89,86 ; 84,74 et 80,39 %. L'évaluation des mêmes produits chimiques sur le terrain montre que l'application de carbendazim (0,2 %) +

oxychlorure de cuivre (0,3 %) deux fois à un intervalle de 15 jours ou de benomyl (0,1 %) + oxychlorure de cuivre (0,3 %) et de proficanzole (0,1 %) + oxychlorure de cuivre (0,3 %), deux fois à un intervalle de 15 à 20 jours s'avère efficace pour lutter contre la flétrissure.

Bien que la lutte chimique contre la maladie de la pourriture soit la plus courante et soit très acceptée car elle est la plus efficace, les produits chimiques doivent être appliqués au moment opportun, à la concentration appropriée. De plus, il faut aussi trouver le laps de temps adapté avant d'utiliser les feuilles pour nourrir le ver à soie. La mauvaise utilisation des produits chimiques pourrait même d'avantage aggraver le problème.

Méthodes biologiques :

La dépendance excessive envers les produits chimiques entraîne un déséquilibre écologique, qui menace les écosystèmes. La pourriture de la racine étant une maladie véhiculée par le sol, non seulement l'utilisation de substances chimiques est coûteuse mais elle entraîne aussi de la pollution atmosphérique, le développement de la résistance par les pathogènes, la destruction des micro-organismes bénéfiques et la rupture de l'équilibre biologique du sol. Récemment, la prise de conscience globale concernant les problèmes de toxicité des pesticides, a encouragé les chercheurs à mettre au point des méthodes pour protéger l'environnement grâce à l'utilisation de microbes bénéfiques et de produits biologiques pour lutter contre les maladies des plantes. Les agents biologiques luttent contre la maladie en produisant des substances toxiques contre les champignons pathogènes et aussi en étant en concurrence avec le pathogène du sol et de la rhizosphère pour les nutriments et l'espace. Le concept de lutte biologique gagne donc du terrain.

Philip et coll., (1995) ont mis au point un biofongicide avec *Trichoderma harzianum* pour lutter contre la pourriture de la racine. Ils ont enregistré une diminution de la maladie de 75 % par rapport au témoin quand on applique un mélange de *T. harzianum* et de fumier (1 : 50) à une quantité de 500 g dans le trou (1 m³) avant la plantation et par la suite à un intervalle de 6 mois.

Rajendran (1996) a rapporté que l'application de *T. viride* et de *T. harzianum* diminue de manière significative l'incidence de la pourriture de la racine à 2,80 % contre 30,60 % chez le témoin. La maladie ne commence à apparaître que 75 jours après la taille (DAP) chez les plants à qui on a appliqué *Trichoderma* tandis que chez le témoin, elle commence 30 jours après la plantation. Il a aussi rapporté que l'application de tourteaux de margousier (*Azadirachta indica*), de pungam (*Pongamia pinnata*) et de ricin (*Ricinus communis*) aux doses de 1000 kg / ha diminue efficacement l'incidence de la pourriture de la racine de mûrier à respectivement 22,20 ; 33,30 et 33,30 %, contre 55,60 % chez le témoin et l'application combinée de *T. viride*-6 avec les engrais biologiques *Azospirillum* ou *Azotobacter* à une concentration de 20 kg / ha diminue considérablement l'incidence de la pourriture de la racine. La croissance mycéliale radiale de *F. solani* et de *F. oxysporum* est inhibée jusqu'à 76,9 et 85,7 % par un extrait de tourteau de margousier à 20 %, tandis que l'extrait de feuille de margousier inhibe la croissance mycéliale de respectivement 83,4 et 84,1 %. A la même concentration, l'extrait de feuille de karanj (*Pongamia pinnata*) inhibe la croissance mycéliale de *F. solani* et de *F. oxysporum* à respectivement 50,8 et 42,9 %, tandis que l'extrait de tourteau de karanj inhibe la croissance mycéliale de *F. solani* et de *F. oxysporum* jusqu'à respectivement 59,1 et 60,6 % (Philip et Sharma, 1997).

Sridhar et coll., (2000) ont étudié l'effet de différents agents antagonistes contre le champignon, *M. phaseolina*, isolé sur des racines de mûrier et constaté que *Bacillus subtilis*, *T. viride* et *Pseudomonas fluorescens* à 25 g / plant diminuent la croissance du pathogène de respectivement 66,7 ; 55,6 et 33,3 % par rapport au témoin. L'évaluation d'isolats variés de *Pseudomonas fluorescens* isolés dans les zones de la rhizosphère du mûrier contre les pathogènes de la pourriture de la racine montre que les isolats *Psf-1* et *Psf-2* sont efficaces contre *F. solani*, *F. oxysporum* et *Botryodiplodia theobromae* (Govindaiah et coll., 2001).

La lutte biologique pourrait faire partie des systèmes de lutte intégrée contre les maladies de manière viable. En matière de lutte biologique, pour utiliser les agents biologiques il faut non seulement apprendre comment on peut modifier l'équilibre biologique du sol pour qu'il devienne préjudiciable à la survie du pathogène et à son activité mais aussi comprendre parfaitement l'interaction mycoparasite – pathogène ainsi que sa relation avec le développement de la maladie.

Lutte Intégrée contre la Maladie :

Les mesures de lutte contre la maladie basées sur un composant unique ne sont pas très efficaces et on sait que l'utilisation de mesures chimiques a un certain nombre d'effets indésirables sur l'état du sol comme on l'a mentionné plus haut. A l'heure actuelle, il est nécessaire de mettre au point des pratiques de lutte intégrée contre la maladie comprenant l'utilisation de différentes mesures de lutte.

L'une de ces mesures pourrait être de tremper le système racinaire des jeunes plants de mûrier dans une solution de Dithane M 45 à 0,1 % (Mancozeb 75 % WP) 30 minutes avant de les planter et d'appliquer *Trichoderma harzianum* à raison de 500 g / plant autour des racines dans au moins 2 à 3 rangées autour des plants infestés après avoir retiré le sol sur une profondeur de 12 à 15 cm (Sharma, 1999).

On peut aussi couper et brûler les parties des plantes atteintes, procéder à l'application dans le sol de 0,2 % de carbendazim ou de captan là où le plant a été déraciné après avoir aéré le sol, tremper les racines dans une solution de carbendazim à 0,2 % pendant 30 minutes, vaporiser les bouts coupés et les souches avec du carbendazim à 0,2 % et répandre du carbendazim ou du captan à raison de 3,2 kg / ha suivi par une irrigation (Sukumar et coll., 1999). On a réalisé des essais de lutte intégrée contre la maladie en ferme avec le Raksha (*T. harzianum*) et le Dithane M45 (0,1 %) dans des zones sensibles du sud de l'Inde. La technologie permet de réduire la maladie de 53,5 à 77,9 % dans les fermes de la *Regional Sericultural Research Station*, de 57,4 à 77,2 % dans les champs des fermiers et de 73,9 % au *Central Sericultural Research and Training Institute* de Mysore par rapport au témoin (Gupta et coll., 2000).

Une autre des méthodologies testées consiste à éviter les zones très sensibles, à enlever les plantes malades et mortes et à les brûler, puis à administrer 0,25 % d'oxychlorure de cuivre (COC) dans le sol autour des plants de manière répétée à un intervalle de 10 à 15 jours (Dhahira Beevi et Qadri, 2003). De plus, il est nécessaire de déraciner les plants très affectés et de les détruire. On creuse le sol à une profondeur de 30 cm et on le laisse sécher. Plus tard, saupoudrer 5 à 10 g de Dithane M45 / trou et planter le nouveau plant et appliquer 5 à 10 g de Dithane M45 / plant chez les plants proches des plants malades. Par la suite, au bout d'un mois, appliquer un mélange de Raksha (*T. harzianum*) et de FYM (1 : 50) à raison de 500 g / plant à un intervalle de trois mois (Govindaiah et coll., 2003).

Il convient de retirer et de brûler les plants atteints, d'administrer 0,1 % de carbendazim dans le sol, d'appliquer *Bacillus subtilis* et *T. viride* à raison de 25 g / plant avec du FYM (1 : 1 : 1), 30 jours après le traitement et du tourteau de margousier à raison de 1 tonne / ha en quatre doses séparées (Anonyme, 2005).

Etat actuel de la pourriture de la racine au Tamil Nadu :

La présence à grande échelle de pourriture de la racine de mûrier au Tamil Nadu nous a obligé à procéder à une reconnaissance de la maladie. Une étude a été entreprise en 2005 par des scientifiques du *Department of Sericulture and Plant Pathology* de la *Tamil Nadu Agricultural University* (Coimbatore) et par le personnel de vulgarisation du *State Department of Sericulture* (Tamil Nadu) dans la zone de l'ouest du Tamil Nadu.

Un échantillonnage réalisé à dessein dans les muraies atteintes témoigne des informations suivantes pour l'orientation des axes de notre programme de recherche dans le futur.

- L'incidence maximum de la pourriture de la racine dans la circonscription d'Udumalpet est de 33,3 % et à Coimbatore elle est de 6,5 %.

- *M. phaseolina* est le pathogène prédominant en été (70,83 %). On observe l'infestation mixte de *M. phaseolina* et de *Fusarium* spp. pendant les saisons des pluies et de l'hiver (20,83 %).

- L'âge de la culture, les cultures antérieures, les cultures entourant la culture de mûrier en cours, la méthode d'irrigation, le type de sol, la méthode de plantation et l'espacement n'influencent pas la fréquence de la maladie. La maladie est présente dans toutes les différentes conditions.

- La gestion des nutriments influence l'incidence de la maladie.

- La gestion intégrée est plus profitable que l'utilisation d'un seul composant de lutte contre la maladie.

Futures stratégies de recherche :

⇒ Se documenter sur la biodiversité des pathogènes présents dans les zones traditionnelles de sériciculture.

⇒ Estimer la perte de rendement actuelle en termes de feuilles et de cocons par des études systématiques dans toutes les principales zones de culture du mûrier.

⇒ Il faudrait mettre au point un système d'alerte adapté pour aider les fermiers à prendre des mesures de précaution contre l'éruption de la maladie.

⇒ Entreprendre immédiatement un programme d'évaluation des variétés de mûrier utilisées et à rendement élevé à différents endroits dans les zones connues pour permettre l'identification de variétés de mûrier tolérantes.

⇒ Standardiser les techniques d'application des fongicides contre le pathogène et contre les mélanges de pathogènes.

⇒ Explorer le rôle de partenaires des champignons antagonistes potentiels et des organismes bactériens pour mettre au point des stratégies de lutte contre la maladie bon marché et qui ne nuisent pas à l'environnement.

⇒ Identifier des molécules nouvelles en évaluant des fongicides nouveaux.

STUDIES ON TRANSFER OF DISEASE RESISTANT GENES NON-SUSCEPTIBLE TO DENSONUCLEOSIS VIRUS TYPE 1 (BmDNV1) INTO PRODUCTIVE SILKWORM BREEDS

P. SUDHAKARA RAO*, B. NATARAJU, M. BALAVENKATASUBBAIAH &
S. B.DANDIN

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore-570008, India. Tel.No.off:
091-0821-2900571, Fax: 091-0821-2362845, E.mail: parimi_rao@yahoo.com

Rearing of commercial silkworm hybrids resistant to important silkworm diseases is better option particularly in tropical areas where inadequate disinfection methods are practiced. This necessitated the evolution of productive bivoltine silkworm breeds non-susceptible to BmDNV1. Non-susceptibility to BmDNV1 in silkworm is controlled by a single dominant/recessive gene. Seventy silkworm germplasm stocks maintained at Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore were screened against BmDNV1 and two silkworm breeds (C.Nichi and A) non-susceptible to BmDNV1 were identified. Their genetic resistance was established and selected as donor parents. Ten productive, but susceptible bivoltine silkworm breeds are selected as recipient parents and transferred the genes responsible for non-susceptibility to BmDNV1 through cross breeding method. During the course of breeding, individuals having resistance to BmDNV1 is ascertained by per oral inoculation of BmDNV1. Repeated back crossing with their respective recipient parent was carried out to improve the productive traits. After six back crosses, individuals were sib-mated to establish strains having resistant homozygous population with productive merits. Hybrids were made among these resistant breeds and identified two most promising hybrids resistant to BmDNV1 (CSR2DR × CSR4DR and CSR21DR × CSR28DR) for commercial exploitation. The breeding strategies and selection methods adopted were discussed.

Keywords: *Bombyx mori* L, BmDNV1, productive bivoltine hybrids

INTRODUCTION

Frequent crop losses in sericulture particularly in tropical areas can be attributed to aggravated silkworm diseases coupled with unfavorable weather conditions. Although the disinfection of rearing place and apparatus are carried out before onset of silkworm rearing, it is not necessarily adequate to prevent the occurrence of silkworm diseases. In view of inadequate disinfection and unhygienic conditions in silkworm rearing place, use of commercial silkworm breeds resistant to important silkworm diseases is better option (Eguchi *et al.*, 1998). A survey conducted by this laboratory in some parts of Karnataka state, which is a major silk producing state in India has revealed that, of total incidence of flacherie caused by non-occluded virus, 43.63 % infection is mostly due to synergistic effect of *Bombyx mori* Infectious flacherie (BmIFV) and Densonucleosus virus (Nataraju *et al.*, 1998). The densonucleosus virus (DNV) infects the mid-gut epithelium and multiplies in the nuclei of columnar cells of mid-gut epithelium of silkworm. The infected columnar epithelium cells

* Author for correspondence

with hypertrophied nuclei are readily discharged into the gut lumen and the alimentary canal is found to be pale yellow in colour and almost devoid of any contents (Maeda and Watanabe, 1978; Watanabe and Kurihara, 1988; Abe *et al.*, 1993). Non-susceptibility to BmDNV1 infection was found to be controlled by a single recessive gene, Nsd-1 or a dominant gene, Nid-1. (Watanabe and Maeda, 1981) The Nsd-1 gene is located at position 8.3 on the 21st chromosome of the silkworm (Eguchi *et al.*, 1986). These genes can be introduced to an existing commercial race by cross breeding. Thus, an attempt made at this institute to identify the potent donor parents resistant to BmDNV1 and introduction of resistant genes to most useful productive silkworm breeds resulted in identification of two most promising silkworm hybrids non-susceptible to BmDNV1 will be subjected to race authorization test for commercial exploitation.

MATERIALS AND METHODS

Seventy silkworm breeds available in this institute germplasm collection, which includes 30 of diapausing and 40 of non-diapausing group were screened against BmDNV1 and identified 2 resistant donor breeds (C. Nichi and A) for cross breeding. Their genetic inheritance pattern was studied by single back cross method (Tabashnik, 1991) and genetic resistance was established. Ten productive but susceptible popular bivoltine silkworm breeds includes five oval (CSR2, CSR 18, CSR 21, CSR 27, and CSR 35) and five dumbbell (CSR 4, CSR 5, CSR 19, CSR 28 and CSR 29) are used as recipient parents for hybridization.

BmDNV1 inoculum and inoculation:

BmDNV1 was extracted from the mid-gut of infected larvae and confirmed its identity by immunodiffusion method using anti BmDNV1 antibody. For utilization of screening, the stock inoculum 10^{-1} (10%) was diluted to 10 times to obtain 10^{-2} .

100 larvae from each breed having 3 replications with newly moult larvae of 3rd instar were fed. The inoculum was constantly stirred while pipetting out the aliquot with the help of a cyclomixer. After 24 hrs, the larvae were transferred on to fresh uncontaminated mulberry leaves and fed. They were reared till cocooning as per the standard procedure advocated by Datta (1992). During this period, the symptoms of the disease were observed carefully and the cumulative mortality was recorded up to 10th day of post inoculation. The infected larvae were tested for BmDNV1 serologically. The control and treated batches were reared under the prevailing room temperature in a separate room to compare the economic traits and selection effect.

Hybridization and Selection strategies:

The females of selected silkworm breeds spinning oval cocoons were crossed to the males of donor parent *C. Nichi*. In another set, females of dumbbell breeds were crossed to the males of donor parent A expecting that the crossing over on the male chromosome of resistant variety (Watanabe, 2002). However, reciprocal crosses were also maintained to cross verify. These resultant lines are exposed to BmDNV1 inoculation in every alternate generation and surviving population were continued and backcrossed to their respective recipient parents. The exposure of larvae to the virus is continued in subsequent alternate generations till the fixation of the targeted traits. The end of BC6 allowed sib mating of resistant population and by BC6S3, five ovals and five dumbbell lines were established resistant to BmDNV1.

Hybrid evaluation:

Five oval and five dumbbell breeds resistant to BmDNV1 were utilized to prepare 25 F1 hybrids. Composite layings were brushed in mass and rearing was conducted as per the standard rearing procedure. Three hundred freshly moult out III instar larvae each in three replications were separated and inoculated with BmDNV1 inoculum along with popular control hybrid CSR2 × CSR 4. Rearing

was conducted twice during March-April and May – June, 2005. The same number of larvae in three replications each of 25 hybrids and control hybrid was continued under normal rearing conditions. Data were recorded on six important economic traits such as fecundity, pupation rate, cocoon weight, cocoon shell weight, cocoon shell ratio and filament length. The rearing and reeling data obtained were subjected to Evaluation index method (Mano *et al.*, 1992). Based on the performance, two most promising hybrids resistant to BmDNV1 (CSR2DR × CSR4DR and CSR21DR × CSR28DR) were identified for commercial exploitation. These two selected hybrids and their parents are further challenged with BmIFV ($10^{-4.5}$ dilutions) and BmNPV (10^7 POB/ml) to know their susceptibility status to other major viral diseases.

RESULTS

The survival percentage of the selected germplasm stocks showing marginal and more resistance were presented in Fig. 1. Among 70 stocks, 6 breeds namely Sarupat, BL37, 96C, CSR18, NJ3 and Hu 204 has shown marginal resistance with a survivability percent of 35 – 50; while *C. Nichi* and A were shown 73 and 79 % survivability respectively on challenging with BmDNV1 virus.

The inheritance pattern of two selected donor parents *C. Nichi* and A were presented in Table I indicates that the mortality of *C. Nichi* (R) was only 21 % and the mortality of A is found to be 27 % where as susceptible breed NB4D2 (S) was 100 %. The F1 hybrid of *C. Nichi* and NB4D2 had the mortality of 20 and 18 % and in hybrid between A and NB4D2 is 94 and 95 % respectively in reciprocal

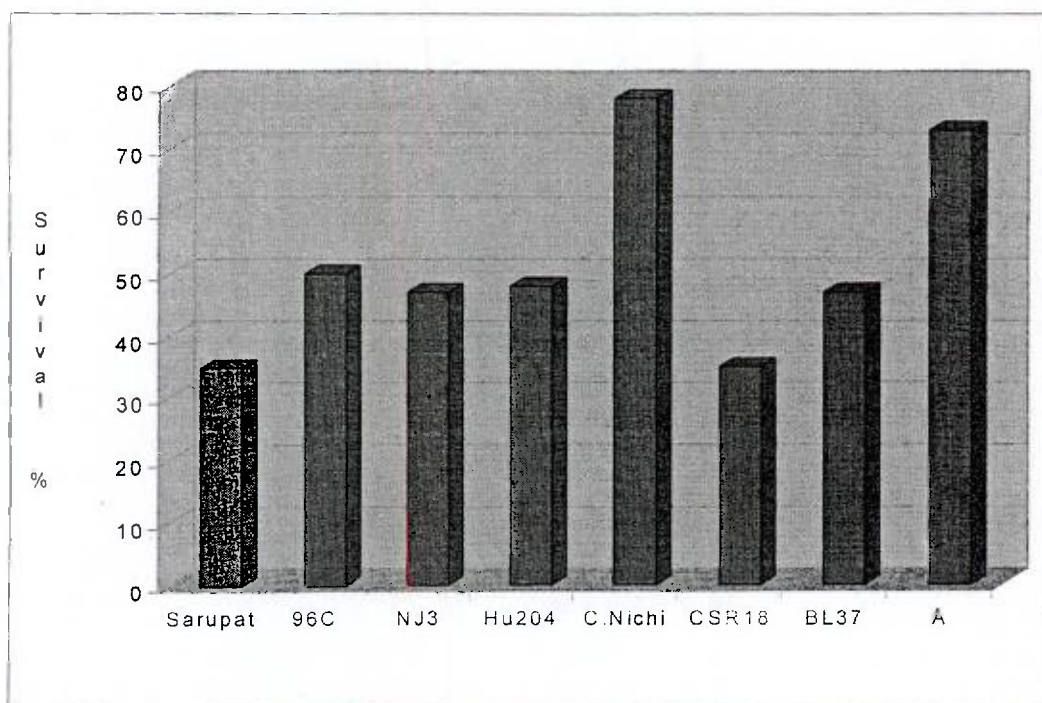


Fig. 1. Survivability status of selected germplasm stocks.

Fig. 1. Survie des souches de germoplasmes sélectionnées.

Survival % / % de Survie.

crosses. During F2 generation only 29.59 % of the total population died due to infection, whereas 70.41 % remained uninfected in *C. Nichi* × NB4D2. In A × NB4D2, 71.77 % of the population died due to infection and 28.23 % remained uninfected indicates the major gene role in *C. Nichi* and a recessive gene action in A.

Table I. Inheritance of resistance to *BmDNV1* in donor parents.

Tableau I. Héritéité de la résistance à *BmDNV1* chez les parents donneurs.

Test material	No. of larvae inoculated	No. of larvae infected	Mortality (%)	Survival (%)
<i>Matériel test</i>	<i>Nbre de larves inoculées</i>	<i>Nbre de larves infestées</i>	<i>Mortalité (%)</i>	<i>Survie (%)</i>
NB4D2 (S)	100	100	100	0.00
<i>C. Nichi</i> (R)	100	21	21.00	79.00
F1 (R × S)	100	20	20.00	80.00
F1 (S × R)	100	18	18.00	82.00
F2 (F1 × F1)	463	137	29.59	70.41
BCS (F1 × S)	540	254	47.03	52.97
BCR (F1 × R)	485	61	12.58	87.42
A (R)	100	27	27.00	73.00
F1 (R × S)	100	94	94.00	6.00
F1 (S × R)	100	95	95.00	5.00
F2 (F1 × F1)	418	300	71.77	28.23
BCS (F1 × S)	452	419	92.70	7.30
BCR (F1 × R)	436	212	48.62	51.38

The performance of breeding resource material under normal and on inoculation of *BmDNV1* virus before initiation of hybridization is presented in Table II. The results indicated that except donor parents *C. Nichi* and A, almost all recipient parents are susceptible to *BmDNV1* but having productive merits. The six times inoculation results (Table III) indicates that the survival rate is ranging 22-28 % and following the Mendelian pattern of inheritance while breeding but productivity traits are effected badly in the initial generations. By BC6S3 (selfing of resistant population) the survival rate increased 80 % with productive merits were presented in Table IV. The performance of selected hybrids along with control hybrid under normal and inoculated conditions of *BmDNV1* were presented in Table V indicates a survival rate of around 80 % with better economic traits. Where as control hybrid has shown only 10.3% survival under inoculated conditions. Results of selected hybrids and their parents when challenged with *BmIFV* have shown a survival rate ranged from 71-87 % and it is between 55-70 % for *BmNPV* (Table. IV) in the parents, where as in selected hybrids, survival rate ranged between 80-86 % for *BmIFV* and 60-65 % for *BmNPV* (Table V). The overall picture shows that the newly evolved breeds and their hybrids have acquired the resistance character and are having productive merits.

Table II. Performance of selected donor and recipient parents under normal conditions (Mean of 6 trials).

Tableau II. Performance du donneur sélectionné et des parents récepteurs dans des conditions normales (Moyenne de 6 essais).

Donor breeds	Larval characters	Cocoon shape	Fecundity (no.)	Pupation rate (%)	Cocoon weight (g)	Shell weight (cg)	Shell ratio (%)	Survival on inoculation (%)
<i>Lignées donneuses</i>	<i>Caractères larvaires</i>	<i>Forme du cocon</i>	<i>Fécondité (nbre)</i>	<i>Taux de nymphose (%)</i>	<i>Poids du cocon (g)</i>	<i>Poids de la coque (cg)</i>	<i>Richesse soyeuse (%)</i>	<i>Survie après l'inoculation (%)</i>
C. Nichi	Plain / Uni	Peanut / Cintrée	357	90.4	1.069	13.3	12.71	79.00
A	Plain / Uni	Oval	421	84.0	1.594	27.5	17.20	73.00
Recipients / Récepteurs								
CSR2	Plain / Uni	Oval	530	86.2	1.870	42.2	22.56	0.00
CSR27	Plain / Uni	Oval	560	87.4	1.665	40.1	24.00	0.00
CSR35	Plain / Uni	Oval	551	85.1	1.727	42.1	24.33	1.00
CSR21	Plain / Uni	Oval	551	89.1	1.680	40.3	24.00	2.00
CSR23	Plain / Uni	Oval	451	92.2	1.731	36.6	21.20	0.00
CSR4	Plain / Uni	Peanut / Cintrée	524	90.0	1.860	41.9	22.50	0.00
CSR5	Plain / Uni	Peanut / Cintrée	500	88.0	1.850	44.4	24.00	0.00
CSR28	Marked / Marqué	Peanut / Cintrée	525	85.0	1.660	38.1	22.90	0.00
CSR50	Marked / Marqué	Peanut / Cintrée	515	88.0	1.680	37.5	22.30	13.00
CSR19	Sex-limited Limité au sexe	Peanut Cintrée	500	94.0	1.650	36.3	22.00	11.00

DISCUSSION

Very few reports are available on the breeding of silkworm stocks resistant to densovirus (Eguchi *et al.*, 1998; Chen keping *et al.*, 2001 and Singh *et al.*, 2003; Sivaprasad and Chandrashekaraiah, 2003). In the present study an attempt made to introduce a recessive/dominant resistant gene available in the low yielding donors (*C. Nichi* and A) to productive but susceptible silkworm breeds is successful. The resultant lines are resistant to *BmDNV1* and productive. As could be seen from the Table III that the surviving population on inoculation with *BmDNV1* has shown clear ratio of 1:3 Mendelian pattern (survival 25: dead 75) while backcrossing and cocoon traits are inferior in initial generations. This may be due to the fact that the donor parents are low productive. In the process of breeding individual male population showing above average values particularly for cocoon weight and cocoon shell ratio from respective recipient parents were selected for back crossing to improve the productivity. With the increase of backcrossing frequency, it was possible to make improvement in economical characters to recover to the original breed level. The continuous sib-mating of resistant individuals of virus inoculation by three times has established non-susceptible lines to *BmDNV1* (Table IV). The homozygous population has shown that the lines are resistant and productive. Since the complete resistance to *BmDNV* is controlled by single recessive gene, *Nsd-1* or by a dominant non-susceptible gene, *Nid-1*, it is possible to transfer these genes to excellent silkworm varieties. Further, the studies also indicated that the breeds/hybrids resistant to *BmDNV* also seems to be resistant to *BmIFV* too and the present findings are in parallel with earlier findings of Watanabe, 1994. The moderate tolerance level shown by breeds and their hybrids to *BmNPV* infection may also be helpful to boost survivability in areas where there is incomplete disease management is practiced.

Table III. Performance of breeding lines on inoculation with *BmDNV1* by BC6.Tableau III. Performance de lignées après l'inoculation de *BmDNV1* au stade BC6.

Breed	Survival (%)	Mortality (%)	Cocoon weight (g)	Shell weight (cg)	Shell ratio
Lignée	Survie (%)	Mortalité (%)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (cg)	Richesse soyeuse (%)
CSR2 DR	25.75	74.25	1.412	31.3	22.2
CSR27 DR	25.38	74.62	1.395	30.3	22.0
CSR35 DR	22.86	77.14	1.499	33.2	22.2
CSR21 DR	24.68	75.32	1.375	29.2	21.2
CSR18DR	27.89	72.11	1.353	27.9	20.6
CSR4 DR	23.74	76.26	1.425	33.3	23.5
CSR5 DR	23.95	76.05	1.461	32.1	22.0
CSR28 DR	27.99	72.01	1.266	27.1	21.3
CSR29DR	26.10	73.90	1.325	28.9	21.8
CSR19 DR	25.64	74.36	1.284	26.6	20.7

Table IV. Performance of selected breeding lines of sib -mated population by three selfings (Mean $\pm$ SD).

Tableau IV. Performance de lignées sélectionnées à partir d'une population après trois accouplements frères-soeurs. (Moyenne $\pm$ Ecart type).

Breed	Fecundity (No.)	Pupation rate (%)	Cocoon weight (g)	Shell weight. (cg)	Shell ratio (%)	Filament length (m)	Survival on inoculation (%)		
Lignée	Fécondité (Nbre)	Taux de nymphe (%)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (cg)	Richesse soyeuse (%)	Longueur du filament (m)	Survie à l'inoculation (%)		
							DNV	IFV	NPV
CSR2 DR	516 $\pm$ 6.03	89.6 3.10	1.656 0.05	39.0 0.01	23.6 0.22	952 14.51	80.0 1.00	83.6 1.53	55.0 1.00
CSR21DR	546 $\pm$ 17.95	89.5 1.32	1.793 0.05	40.9 0.01	22.8 0.50	903 78.65	82.6 1.53	85.3 0.58	60.0 2.00
CSR4DR	493 $\pm$ 7.23	89.1 0.36	1.756 0.03	37.4 0.02	21.30 1.00	811 58.01	92.3 1.53	87.0 1.00	68.0 0.58
CSR28DR	516 $\pm$ 31.6	88.1 4.04	1.590 0.11	34.3 0.03	21.5 0.35	894 22.14	82.6 1.53	71.3 1.15	70.00 2.00

Table V. Performance of selected hybrids under normal and inoculated conditions (Mean of 2 trials).*Tableau V. Performance d'hybrides sélectionnés sous des conditions normales et d'inoculation (Moyenne de 2 essais).*

Hybrid	Pupation rate	Cocoon weight	Shell weight	Shell ratio	Filament length	Survival on inoculation (%)		
Hybride	Taux de nymphose (%)	Poids du cocon (g)	Poids de la coque (cg)	Richesse soyeuse (%)	Longueur du filament (%)	% de survie à l'inoculation (%)		
						DNV	IFV	NPV
CSR2DR × CSR4DR	97.7	1.812	42.3	23.3	1151	81.3	80.0	60.0
CSR21DR × CSR28DR	94.3	1.885	44.0	23.4	1062	80.0	86.0	65.0
CSR2 × CSR4 (control / témoin)	96.1	1.815	41.7	23.0	1021	10.3	15.8	40.0
CD at 5%	1.17	0.44	0.09	—	20	2.73	4.53	1.58

The purpose of breeding with pathogen load is to create the conditions which can make the genotype of disease resistance appear completely in order to select them for such rearing environment where inadequate disease management practices are prevailing. The genotype one with disease resistance gene always has much more chance to survive. Most of the small and marginal farmers in India are unable to practice complete disease management practices where these breeds are better option and facilitate the introduction of bivoltine sericulture technology in tropical areas.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are thankful to Dr. H. K. Basavaraja, Joint Director, Silkworm breeding for supplying productive silkworm breeds, useful discussion and Mr. A. K. Palit, Assistant Director (Economics) for analyzing data.

REFERENCES

- ABE, H.; SHIMADA, T.; KOBAYASHI, K.; MAEDA, S.; YOKOYAMA, T.; OSHIKI, T. & KOBAYASHI, M. (1993) Detection of Densonucleosis virus in the silkworm, *Bombyx mori* from fecal specimens by polymerase chain reaction. J. Seric. Jpn., 62: 376-381.
- CHEN, K.; LI, M.; YAO, Q.; LIN, S. & HOU, C. (2001) Breeding of new germplasm of silkworm (*Bombyx mori*) resistant to Zhenjiang (China) strain of Densonucleosis Virus (DNV-Z). Sericologia, 41: 21-27.
- DATTA, R. K. (1992) Guidelines for rearing bivoltines. Bull of Central Silk Board, Bangalore, India. p. 23.

- EGUCHI, R.; FURUTA, Y. & NINAKI, O. (1986) Dominant non-susceptibility to densovirus in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 55: 177-178.
- EGUCHI, R.; HARA, W.; SHIMAZAKI, A.; HIROTA, K.; ICHIBA, M.; NINAGI, O. & NAGAYASU, K. (1998) Breeding of the silkworm race "Taisei" non-susceptible to a densovirus type 1. J. Seric. Sci. Jpn., 67: 361-366.
- MAEDA, S. & WATANABE, H. (1978) Immunofluorescence observation of the infection of densovirus in the silkworm, *Bombyx mori*. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool., 22: 98-101.
- MANO, Y.; NIRMAL KUMAR, S.; BASAVARAJA, H. K.; MALREDDY, N. and DATA, R. K. (1992) An index for multiple trait selection for silk yield improvement in *Bombyx mori* L.. Nat. Conf. Mulb. Seric. Res., Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore, India, Dec, 1992 pp.116.
- NATARAJU, B.; DATTA, R.K.; BAIG, M.; BALAVENKATASUBBAIAH, M.; SAMSON, M.V. & SIVAPRASAD, V. (1998) Studies on the prevalence of nuclear polyhedrosis in sericultural areas of Karnataka. Indian J. Seric. 37: 154-158.
- SINGH, G. P.; XUMENGKUI; CHEN YUYIN & DATTA, R. K. (2003) Development of Resistance to *Bombyx mori* Densovirus into a Susceptible Silkworm Breed. Int. J. Indust. Entomol., 6: 145-149.
- SIVAPRASAD, V. & CHANDRASHEKHARIAH (2003) Strategies for Breeding Disease Resistant Silkworms. In: Concept papers in Mulberry Silkworm Breeders Summit. 18-19th July, 2003; 69-76. Printed and Published by Dr. Chandrashekharaiah, Director, APSSRDI, Hindupur. Andhrapradesh, India.
- TABASHNIK, B. E. (1991) Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with back-cross experiments. J. Econ. Entomol., 84: 703-712.
- WATANABE, H. & MAEDA, S. (1981) Genetically determined non-susceptibility of the silkworm, *Bombyx mori* to infection with a densovirus (Densovirus). J. Invertbr. Pathol., 38: 370-373.
- WATANABE, H. & KURIHARA, Y. (1988) Comparative histopathology of two densovirus in silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertbr. Pathol., 51: 287-290.
- WATANABE, H. (1994) Densovirus of the silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 33: 114-117.
- WATANABE, H. (2002) Genetic resistance of the silkworm, *Bombyx mori* to viral diseases. Curr. Sci., 83: 439-446.

ETUDE SUR LE TRANSFERT DE GENES DE RESISTANCE AU VIRUS DE LA DENSONUCLEOSE DE TYPE 1 (BmDNV1) CHEZ DES LIGNEES DE VERS A SOIE PRODUCTIVES

P. SUDHAKARA RAO*, B. NATARAJU, M. BALAVENKATASUBBAIAH &
S. B. DANDIN

Central Sericultural Research and Training Institute, Mysore – 570 008, Inde. No. de tel :
091-0821-2900571, Fax : 091-0821-2362845, E-mail : parimi_rao@yahoo.com

L'élevage d'hybrides de vers à soie commerciaux résistant à des maladies importantes du ver à soie est la meilleure option particulièrement dans les zones tropicales où les méthodes de désinfection auxquelles on a recours sont inadéquates. On a donc besoin de mettre au point des lignées de ver à soie bivoltines productives non-sensibles à BmDNV1. La non-sensibilité à BmDNV1 chez le ver à soie est contrôlée par un gène unique dominant / récessif. On a analysé soixante dix souches de germoplasmes du ver à soie maintenues au Central Sericultural Research and Training Institute, de Mysore et on a identifié deux lignées de ver à soie (C. nichii et A) non-sensibles à BmDNV1. On a établi leur résistance génétique et on les a sélectionnées comme parents donneurs. On sélectionne dix lignées de vers à soie bivoltines productives mais sensibles comme parents récepteurs et on transfère les gènes responsables de la non-sensibilité à BmDNV1 par la consanguinité. Au cours du lignage, on s'assure de la résistance des individus à BmDNV1 par l'inoculation orale de BmDNV1. On procède à un croisement de retour répété avec leur parent récepteur respectif pour améliorer les caractères productifs. Après six croisements de retour, on accouple les individus entre frères et sœurs pour établir des souches homozygotes résistantes avec des mérites productifs. On réalise des hybrides entre ces lignées résistantes et on identifie les deux hybrides les plus prometteurs résistant à BmDNV1 (CSR2DR × CSR4DR et CSR21DR × CSR28DR) pour l'exploitation commerciale. Nous présentons les méthodes de sélection et les stratégies de lignage adoptées.

INTRODUCTION

On peut attribuer les pertes fréquentes de récoltes en sériciculture en particulier dans les zones tropicales à des maladies aggravées du ver à soie associées à des conditions météorologiques défavorables. Bien que l'on procède à la désinfection du lieu et des appareils d'élevage avant le début de l'élevage du ver à soie, cela n'est pas nécessairement approprié pour prévenir l'éruption des maladies du ver à soie. Compte tenu de la désinfection médiocre et des conditions non-hygiéniques du lieu d'élevage du ver à soie, l'utilisation de lignées de ver à soie commerciales résistant à des maladies importantes est la meilleure option (Eguchi et coll., 1998). Une étude réalisée par notre laboratoire dans certaines parties de l'état du Karnataka, qui est l'un des principaux états producteurs de soie en Inde, révèle que, sur l'incidence totale de flacherie provoquée par un virus non occlus, 43,63 % de l'infestation est principalement due à l'effet synergique de la flacherie infectieuse de *Bombyx mori* (BmIFV) et du virus de la denso nucléose (Nataraju et coll., 1998). Le virus de la denso nucléose (DNV) infeste l'épithélium de l'intestin moyen et se multiplie dans les noyaux des

* Auteur auquel adresser la correspondance.

cellules colonnaires de l'épithélium de l'intestin moyen du ver à soie. Les cellules colonnaires infestées de l'épithélium, aux noyaux hypertrophiés, sont facilement déchargées dans la lumière de l'intestin et le canal alimentaire s'avère être de couleur jaune pâle et presque dépourvu de contenu (Maeda et Watanabe 1978 ; Watanabe et Kurihara, 1988 ; Abe et coll., 1993). On constate que la non-sensibilité à l'infestation par BmDNV1 s'avère être contrôlée par un gène unique récessif, Nsd-1, ou un gène dominant, Nid-1 (Watanabe et Maeda, 1981). Le gène Nsd-1 se situe à la position 8,3 sur le chromosome 21 du ver à soie (Eguchi et coll., 1986). On peut introduire ces gènes chez une race commerciale actuelle par un croisement de retour. Nous avons donc essayé d'identifier des parents donneurs puissants résistant à BmDNV1 et l'introduction de gènes résistants chez des lignées de ver à soie productives très utiles a permis l'identification de deux hybrides de vers à soie très prometteurs non-sensibles à BmDNV1, qui seront soumis à un test d'autorisation pour l'exploitation commerciale.

MATERIELS ET METHODES

On a analysé soixante dix lignées de vers à soie disponibles dans la collection de germoplasmes de notre institut, comprenant 30 du groupe avec diapause et 40 du groupe sans diapause contre BmDNV1 et on a identifié deux lignées donneuses résistantes (*C. nichii* et *A*). On étudie leur modèle d'hérédité par la méthode de croisement de retour unique (Tabashnik, 1991) et on établit la résistance génétique. On utilise comme parents récepteurs pour l'hybridation dix lignées de vers à soie bivoltines productives mais sensibles qui comprennent cinq lignées à cocons ovales (CSR2, CSR 18, CSR 21, CSR 27 et CSR 35) et cinq lignées à cocons cintrés (CSR 4, CSR 5, CSR 19, CSR 28 et CSR 29).

Inoculum BmDNV1 et inoculation :

On extrait BmDNV1 de l'intestin moyen de larves infestées et on confirme son identité par la méthode de l'immunodiffusion en utilisant un anticorps anti BmDNV1. Pour le screening, l'inoculum souche est de 10^{-1} (10 %) dilué dix fois pour obtenir 10^{-2} .

On nourrit cent larves du 3^{ème} âge venant de muer de chaque lignée en trois répétitions. On remue constamment l'inoculum à l'aide d'un cyclomixeur en pipettant l'aliquote. Au bout de 24 h, on transfère les larves sur des feuilles fraîches non contaminées avec lesquelles elles se nourrissent. On les élève jusqu'au filage du cocon d'après la procédure habituelle recommandée par Datta (1992). Pendant cette période, on observe soigneusement les symptômes de la maladie et on enregistre la mortalité cumulative jusqu'au 10^{ème} jour après l'inoculation. On teste les larves par rapport à BmDNV1 de manière sérologique. On élève les lots témoins et traités à température ambiante dans une pièce séparée pour comparer les caractères économiques et l'effet de la sélection.

Stratégies d'hybridation et de sélection :

On croise les femelles des lignées de vers à soie sélectionnées filant des cocons ovales avec les mâles du parent donneur *C. nichii*. Dans un autre lot, on croise les femelles des lignées cintrées aux mâles du parent donneur *A* en espérant un crossing over de la variété résistante sur le chromosome du mâle (Watanabe, 2002). Cependant, on maintient aussi des croisements réciproques pour procéder à la vérification par recoupement. Les lignées qui en résultent sont exposées à l'inoculation BmDNV1 à chaque génération alternée et on croise en retour la population survivante avec leurs parents récepteurs respectifs. On continue l'exposition des larves au virus au cours des générations alternées suivantes jusqu'à la fixation des traits ciblés. La fin du 6^{ème} croisement de retour (BC6) permet l'accouplement frères-sœurs de la population résistante et à partir de BC6S3, on considère que cinq lignées ovales et cinq lignées cintrées sont résistantes à BmDNV1.

Evaluation des hybrides :

On utilise cinq lignées ovales et cinq lignées cintrées résistantes à BmDNV1 pour préparer 25 hybrides F1. On lève les pontes en masse et on procède à l'élevage d'après la procédure d'élevage

habituelle. On sépare trois cent larves du 3^{ème} âge venant de muer en trois répétitions et on leur inocule BmDNV1 de même que chez l'hybride témoin populaire CSR2 × CSR4. On a procédé à deux élevages en mars-avril et en mai – juin 2005. On continue l'élevage avec le même nombre de larves en trois répétitions contenant 25 hybrides chacune et avec l'hybride témoin dans les conditions normales. On enregistre les données pour six caractères économiques importants tels que la fécondité, le taux de nymphose, le poids du cocon, le poids de la coque soyeuse, la richesse soyeuse et la longueur du filament. Les données d'élevage et de dévidage obtenues sont soumises à la Méthode de l'Indice d'Evaluation (Mano et coll., 1992). D'après les performances, on a identifié deux hybrides très prometteurs résistant à BmDNV1 (CSR2DR × CSR4DR et CSR21DR × CSR28DR) pour l'exploitation commerciale. On confronte ces deux hybrides sélectionnés et leurs parents à BmIFV (dilutions de $10^{-4,5}$) et BmNPV (10^7 POB / ml) pour connaître leur état de sensibilité à d'autres maladies virales majeures.

RESULTATS

Le pourcentage de survie des souches sélectionnées à la résistance marginale ou plus importante est présenté dans la Fig. 1. Parmi 70 souches, 6 lignées à savoir Sarupat, BL37, 96C, CSR18, NJ3 et Hu 204 présentent une résistance marginale avec un pourcentage de survie de 35–50 ; tandis que *C. nichi* et *A* présentent un taux de survie de respectivement 73 et 79 % après infection avec le virus BmDNV1.

Le modèle d'héritage des deux parents donneurs sélectionnés *C. nichi* et *A* qui est présenté dans le Tableau I, indique que la mortalité de *C. nichi* (R) n'est que de 21 % et la mortalité de *A* de 27 %, tandis que pour la lignée sensible NB4D2 (S), elle est de 100 %. L'hybride F1 de *C. nichi* et de NB4D2 a une mortalité de 20 et 18 % et pour l'hybride entre *A* et NB4D2, elle est de respectivement 94 et 95 % dans les croisements réciproques. Pendant la génération F2, seulement 29,59 % de la population totale meurt à cause de l'infestation, tandis que 70,41 % n'est pas infestée chez *C. nichi* × NB4D2. Chez *A* × NB4D2, 71,77 % de la population meurt à cause de l'infestation et 28,23 % n'est pas infestée, ce qui indique le rôle dominant du gène chez *C. nichi* et une action récessive du gène chez *A*.

La performance du matériel ressource pour le lignage dans des conditions normales et avec l'inoculation du virus BmDNV1 avant le début de l'hybridation est présentée dans le Tableau II. Les résultats indiquent qu'à l'exception des parents donneurs *C. nichi* et *A*, presque tous les parents récepteurs sont sensibles à BmDNV1 mais ils ont des mérites productifs. Les résultats de l'inoculation six fois (Tableau III) indique que le taux de survie est compris entre 22 et 28 % et suit le modèle Mendélien d'héritage au cours du lignage mais les caractères de productivité sont sérieusement affectés pendant les premières générations. Au stade de BC6S3 (autofécondation de la population résistante), le taux de survie augmente de 80 % et les mérites productifs sont présentés dans le Tableau IV. La performance des hybrides sélectionnés et de l'hybride témoin dans des conditions normales et d'inoculation de BmDNV1 est présentée dans le Tableau V, elle indique un taux de survie d'environ 80 % avec de meilleurs caractères économiques, tandis que l'hybride témoin ne présente que 10,3 % de survie lorsqu'il est inoculé. Les hybrides sélectionnés et leurs parents quand on les infeste avec BmIFV présentent un taux de survie compris entre 71 et 87 % et il est compris entre 55 et 70 % pour BmNPV (Tableau IV) chez les parents, tandis que chez les hybrides sélectionnés, le taux de survie est compris entre 80 et 86 % pour BmIFV et entre 60-65 % pour BmNPV (Tableau V). Globalement, il en ressort que les lignées venant d'être mises au point et leurs hybrides ont acquis le caractère de la résistance et ont des mérites productifs.

DISCUSSION

Il existe très peu de rapports sur le lignage de souches de ver à soie résistantes au virus de la denso-nucléose (Eguchi et coll., 1998 ; Chen keping et coll., 2001 et Singh et coll., 2003 ; Sivaprasad

et Chandrashekaraiah, 2003). Dans cette étude, nous avons essayé avec succès d'introduire un gène récessif/ dominant, disponible chez les donneurs à faible rendement (*C. Nichi* et A), chez des lignées de vers à soie productives mais sensibles. Les lignées obtenues sont résistantes à BmDNV1 et productives. Comme on peut l'observer d'après le Tableau III, la population ayant survécu à l'inoculation avec BmDNV1 présente un ratio selon le modèle Mendélien de 1 : 3 (25 survivants : 75 morts) dans le croisement de retour et les caractères du cocon sont inférieurs chez les premières générations. Cela pourrait être dû au fait que les parents donneurs sont peu productifs. Au cours du processus de lignage, on sélectionne des individus mâles présentant des valeurs au-dessus de la moyenne particulièrement pour le poids du cocon et la richesse soyeuse à partir des parents récepteurs respectifs, pour le croisement de retour afin d'améliorer la productivité. Avec l'augmentation de la fréquence des croisements de retour, il est possible d'améliorer les caractères économiques pour retrouver le niveau de la lignée d'origine. L'accouplement continu frères – sœurs des individus résistants à l'inoculation du virus trois fois de suite permet d'établir des lignées non sensibles à BmDNV1 (Tableau IV). La population homozygote montre que les lignées sont résistantes et productives. Puisque la résistance complète à BmDNV est contrôlée par un gène récessif unique, *Nsd-1*, ou par un gène dominant non-sensible *Nid-1*, il est possible de transférer ces gènes à d'excellentes variétés de vers à soie. Par ailleurs, les études indiquent aussi que les lignées / hybrides résistant à BmDNV semblent également résistantes à BmIFV et ces résultats sont en accord avec les précédents résultats de Watanabe, 1994. Le niveau de tolérance modérée à l'infestation par BmNPV présenté par les lignées et leurs hybrides pourrait aussi être utile pour accroître la survie dans les zones où la lutte contre la maladie est incomplète.

Le but du lignage avec une attaque par le pathogène est de créer les conditions qui peuvent faire que le génotype présentant la résistance à la maladie apparaisse complètement, de manière à le sélectionner pour un environnement d'élevage où les pratiques de lutte contre la maladie sont en grande partie inadéquates. Le génotype avec le gène de résistance à la maladie a toujours plus de chance de survivre. La plupart des petits et moyens fermiers en Inde ne sont pas capables d'avoir recours à des pratiques de lutte complètes contre la maladie. Pour eux ces lignées sont la meilleure option et elles facilitent l'introduction de la technologie de la sériciculture bivoltine dans les zones tropicales.

NEW MICROSPORIDIA CAUSING INFECTION IN SILKWORM, *BOMBYX MORI* L.

A. G. K. DANIEL, R. N. SINGH, S. S. SINDAGI & C. K. KAMBLE

Silkworm Seed Technology Laboratory, Carmelaram post, Kodathi, Bangalore-560 035, India.

*Microsporidiosis or Pebrine disease is a dreadful disease of the silkworm **Bombyx mori** which causes great losses in cocoon yield. In sericulture, the infected wild butterflies may act as natural reservoirs of microsporidian infective to silkworm. In the present study different mulberry insect pests/wild Butterflies were collected from Sericultural areas of Karnataka, and screened for presence of microsporidia. Two new microsporidia were observed and isolated from Pierid-yellow butterfly, **Eurema hecabe** and Lycaenid-blue butterfly, **Zizina otis** and we studied the infectivity and degree of pathogenicity of the isolated new microsporidia for the silkworm **Bombyx mori**. Both microsporidia were found to be infective to the silkworm **Bombyx mori**, but only microsporidian isolated from **Eurema hecabe** was found to have transovarian transmission in silkworm.*

Keywords: Pebrine, microsporidia, cross infectivity.

INTRODUCTION

Microsporidiosis or Pebrine has been understood since long to be caused by a highly virulent parasitic microsporidian, *Nosema bombycis* Naegeli. When pandemic of pebrine happened in southern France in 1845, it attracted the interest of scientists in Europe. Pasteur (1870) established the causative agent of pebrine. Balbiani (1882) established microsporidia in Sporozoa. Labbe (1899) listed one family (Nosematidae), three genera (*Nosema*, *Pleistophora* and *Thelohania*), 33 named species and 20 unnamed species of microsporidia. Currently, there are 143 genus of microsporidia and the exact number of described species of microsporidia is difficult to ascertain, with estimates ranging from 900 to 1300 (Kawarabata, 2003). Microsporidiosis differs from other silkworm diseases, as it is transmitted both horizontally and vertically. The horizontal transmission occurs through the feeding of contaminated leaf and vertical transmission through infected eggs (Chang 1973, Yup-lian, 1995). Different mulberry pests and wild lepidopteron were also known to harbour microsporidia, more than sixty wild insects were found to be having microsporidian spores and about twenty of them can cross infect silkworm (Kawarabata, 2003).

The perpetual incidence of microsporidian infection in silkworm may be due to various sources of secondary contamination including alternate hosts in and around mulberry garden. In addition to *Nosema bombycis* seven other microsporidia belonging to the genera *Nosema*, *Pleistophora* and *Thelohania* have been isolated from the silk moth. These microsporidians differ in their morphology, target tissues and virulence and have been tentatively designated as M11, M12 and M14 (*Nosema* sp.); M24, M25 and M27 (*Pleistophora* sp.) and M32 (*Thelohania* sp) (Fujiwara, 1980 & 1984a, b & 1985). Of late, the type M12 has been classified under the genus *Vairimorpha*, since it differs from *Nosema* types in having an octosporious type of sporogony (Sato and Watanabe, 1985). The present study was taken with the aim to screen mulberry insect pests/wild Butterflies for new microsporidia and to study the infectivity and degree of pathogenicity of isolated microsporidia to silkworm *Bombyx*

mori. Two new microsporidia were observed and isolated from Pierid-yellow butterfly, *Eurema hecabe* and Lycaenid-blue butterfly, *Zizina otis*.

MATERIALS AND METHODS

(i) Collection and screening of insects:

Different insect pests and wild butterflies were collected in and around mulberry fields of Karnataka seed areas (multivoltine and Bivoltine). In addition to this, insect pests were collected randomly from different Sericultural areas of south India. Insects from neighboring field crops of mulberry garden were also collected. Collected insects were screened for presence of microsporidia. Insects were homogenized individually in 0.6% K₂CO₃ solution, filtered, centrifuged at 1500 × g for 3 minutes. The sediment was examined under phase contrast microscope.

(ii) Morphological observations of microsporidia isolated from butterflies:

Isolated microsporidia were purified by differential centrifugation followed by density gradient purification by using Percoll[®] (Sato and Watanabe, 1980) and morphological characteristics of microsporidia have been recorded and compared with *Nosema bombycis* Naegeli (1857).

(iii) Germination of microsporidia isolated from butterflies:

The germination response of the new microsporidia were studied and compared with the standard strain of *N. bombycis* by following neutralization method (Ohshima, 1937). The freshly purified spores of the new microsporidia and *N. bombycis* spores were incubated for 30 min in different concentrations of KOH solution (0.1N, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7% and 0.8%). The treated samples after incubation were neutralized with PBS (Phosphate buffered saline, pH 6.8) and were observed for germination of spores under phase contrast microscope. Germinated spores appeared black under phase contrast microscope and the thin polar filaments extruded from the spore with round sporoplasm at their tips were observed. % of germination calculated using method given by Undeen and Avery (1984)

(iv) Infectivity and pathogenicity of microsporidia isolated from butterflies in the silkworm:

The isolated microsporidian from *Eurema hecabe* and *Zizina otis* was purified and inoculated in the silkworm larvae (from disease free stocks maintained in laboratory, NB₄D₂ strain) after the 2nd moult (3rd instar 1st day) with 10⁷ spores/mL by following standard inoculation method (Nataraju *et al.*, 2003). Site of infection in the tissues of larvae was assessed after 10th day of inoculation and compared with standard strain of *N. bombycis*.

In the second part of the experiment, the microsporidia isolated from butterflies were inoculated in the silkworm larvae (NB₄D₂ strain, 40 larvae per replication, 10 replication) after the 2nd moult (3rd instar 1st day) with 10⁷ spores/mL to assess the infection level at larval, pupal and moth stage. *N. bombycis* inoculated batch was also maintained for comparison.

(v) Assay on transovarial transmission of microsporidia in NB₄D₂ and PM silkworm strain:

The transovarian transmission of the two microsporidia was studied using NB₄D₂ as the test strain. The larvae were inoculated after 3rd moult (1st day of 4th instar) with different inoculum load (1×10⁵, 1×10⁶ and 1×10⁷ spores/mL) and allowed for cocooning and emergence. Layings were prepared from the infected moth. Five infected layings, each of which represented one replication were assessed for infection at egg and larval stage. Eggs were incubated and brushed. All the dead eggs were tested for the infection. Hundred chawki larvae were randomly selected out of 1st moult from each replication, and assessed for infection.

In the second part of the experiment, the microsporidia isolated from butterflies were also inoculated in a similar manner using 1×10^6 spores/mL inoculum load in silkworm larvae after 3rd moult (1st day of 4th instar) of PM (mutivoltine) and NB₄D₂ (bivoltine) strains and compared the rate of transovarian transmission in these strains. *Nosema bombycis* inoculated batch was also maintained for comparison. Transovarian transmission rate was calculated with standard formula $[(A \times B) + (C \times D)] / (A + C)$ (A- no. of dead eggs, B- % of dead eggs infected, C- no. of hatched larvae, D- % of larvae infected) given by Han and Watanabe (1988).

RESULTS

(i) Collection and screening of insects:

In the present study a total of 7767 insect specimens belonging to different orders (Lepidoptera, Homoptera, Coleoptera & Orthoptera) were collected and examined for the presence of microsporidia. Two microsporidia was observed and isolated from Pierid, yellow butterfly, *Eurema hecabe* and Lycaenid, Blue butterfly *Zizina otis* (Table I). The isolated microsporidia were purified by repeated centrifugation including gradient centrifugation using Percoll and used for further studies.

(ii) Morphological observations of the two new microsporidia isolated from butterflies (*Eurema hecabe* and *Zizina otis*):

The length and width of the microsporidian spores isolated from *Eurema hecabe* is almost identical with *Nosema bombycis* spores while in case of microsporidian spores isolated from *Zizina otis*, length is observed to be more than that of *N. bombycis* spores (Table II).

(iii) Germination response of the microsporidia isolated from butterflies (*Eurema hecabe* and *Zizina otis*):

N. bombycis spores showed more than 90% germination under all concentrations of KOH. Microsporidian from *Eurema hecabe* showed less than 50% germination at 0.1N to 0.3% concentration of KOH, whereas microsporidian isolated from *Zizina otis* showed germination only at 0.6% to 0.8% concentrations of KOH (Table III).

(iv) Infectivity and pathogenicity microsporidia isolated from butterflies (*Eurema hecabe* and *Zizina otis*) in the silkworm:

Both the new microsporidia isolated from the butterflies were found to be infective to silkworm larvae. In case of microsporidian of *Zizina otis*, infection was observed only in the gut, fat body, malpighian tubule and silk gland after 10 days (Table IV). Infection at moth stage was observed to be less in case of both the new microsporidia isolated from *Eurema hecabe* (84.7%) and *Zizina otis* (43.39%) as compared to *N. bombycis*, where 100% infection was observed (Table V & VI).

(v) Assay on transovarial transmission of microsporidia isolated from *E. hecabe* and *Z. otis* in NB₄D₂ and PM silkworm strain:

The results are presented in Tables VII & VIII. In case of microsporidian of *Eurema hecabe*, transmission rate was 6.3 ± 1.1 % and 6.6 ± 0.9 % at 1×10^6 and 1×10^7 spore/mL inoculum load respectively. No transmission was recorded at 1×10^5 spore/mL. further transmission rate was 4.1 ± 0.7 % in PM as compared to 6.3 ± 1.1 % in NB₄D₂. In case of microsporidian of *Zizina otis* no transovarian transmission was noticed in any category of inoculation. Batch inoculated with *Nosema bombycis* showed 100 % transovarian transmission in both the NB₄D₂ and PM strain.

Table I. Insect pests and wild butterflies collected and tested for their infection by microsporidia.

Tableau I. Recueil et test d'insectes parasites et de papillons sauvages infestés par les microsporidies.

Order	Scientific name	Infection by microsporidia	
		Frequency*	Intensity (spores/insect)
Ordre	Nom scientifique	Infestation par les microsporidies	
		Fréquence *	Intensité (spores / insecte)
Lepidoptera Lépidoptères	<i>Spodoptera litura</i>	0/10	-
	<i>Eupterote mollifera</i>	0/10	-
	<i>Euprotis fraterna</i>	0/10	-
	<i>Amata passalis</i>	0/10	-
	<i>Diaphania pulverulentalis</i>	0/10	-
	<i>Archips micaceana</i>	0/10	-
	<i>Amscta</i> sp.	0/10	-
	<i>Othreis</i> sp.	0/10	-
	<i>Achaea janata</i>	0/10	-
	<i>Heliothis armigera</i>	0/10	-
	<i>Daphnis nerii</i>	0/10	-
	<i>Utetheisa</i> sp.	0/10	-
	<i>Grammodes stolidia</i>	0/10	-
	<i>Catopsilia</i> sps.	7/10	1.68×10^6
	<i>Anaphaeis aurata</i>	0/10	-
	<i>Papilio demoleus</i>	0/10	-
	<i>Telchonia violae</i>	5/10	0.58×10^6
	<i>Danaus chrysippus</i>	0/10	-
	<i>Danaus limiace</i>	0/10	-
	<i>Danaus valgaris</i>	0/10	-
	<i>Danaus plexippus</i>	0/10	-
	<i>Euploe core</i>	0/10	-
	<i>Eurema hecabe</i>	7/10	1.35×10^6
	<i>Eurema brigitta</i>	0/10	-
	<i>Pachliopta hector</i>	0/10	-
	<i>Leptosia nina</i>	0/10	-
	<i>Colotis danae</i>	0/10	-
	<i>Lampides boeticus</i>	0/10	-
	<i>Zizina otis</i>	4/10	0.47×10^6
	<i>Hypolimnas bolina</i>	0/10	-
	<i>Graphium Agamemnon</i>	0/10	-
	<i>Valeria</i> sp.	0/10	-
	<i>Jamides alecto</i>	0/10	-
	<i>Castalius rosimon</i>	0/10	-
	<i>Euthalia nais</i>	0/10	-
	<i>Charaxes fabius</i>	0/10	-
	<i>Melanitis leda</i>	0/10	-
Homoptera	<i>Saissetia nigra</i>	0/10	-
Homoptères	<i>Machonelliooccus hirsutus</i>	0/10	-
	<i>Empoasca flavescens</i>	0/10	-

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

Coleoptera	<i>Myllocerus discolor</i>	0/10	-
Coléoptères	<i>Myllocerus viridanus</i>	0/10	-
Orthoptera	<i>Neorthacris acuticeps nilgriensis</i>	0/10	-
Orthoptères	<i>Cyrtacanthacris ranacea</i>	0/10	-

* x/y indicates occurrence of microsporidia in x infected insects out of y subjects. / *x / y indique la présence de microsporidies dans x insectes infestés sur y sujet.*

- nil / *nulle.*

Table II. Spore size measurements of the two new microsporidia.

Tableau II. Taille de la spore chez deux nouvelles microsporidies.

Microsporidian strain / source	Spore shape	Spore size		
		Length (µm)	Width (µm)	Length / width
Souche / Source des microsporidiens	Forme de la spore	Taille de la spore		
		Longueur (µm)	Largeur (µm)	Longueur / largeur
Isolated from / <i>Isolée sur :</i>				
<i>Eurema hecabe</i>	Oval / <i>Ovale</i>	3.56 ± 0.30	2.62 ± 0.15	1.36 ± 0.16
<i>Zizina otis</i>	Ovo-cylindrical / <i>Ovo-cylindrique</i>	4.75 ± 0.53	2.56 ± 0.13	1.86 ± 0.20
<i>Nosema bombycis</i>	Oval / <i>Ovale</i>	3.65 ± 0.12	2.60 ± 0.09	1.40 ± 0.07
CD (P ≤ 0.05)		0.33	NS	NS

Table III. Germination performance of microsporidia.

Tableau III. Performance de germination des microsporidies.

KOH solution <i>Solution KOH</i>	<i>Nosema bombycis</i>	Microsporidian from <i>Microsporidien de</i>	
		<i>Eurema hecabe</i>	<i>Zizina otis</i>
0.1 N	+++	+	--
0.1%	+++	+	--
0.2%	+++	+	--
0.3%	+++	+	--
0.4%	+++	++	--
0.5%	+++	++	--
0.6%	+++	++	+
0.7%	+++	++	+
0.8%	+++	++	+

+++ : > 80% ++ : 50–80% + : < 50 % -- : nil / nulle.

Table IV. Site of infection of microsporidian spores isolated from *Eurema hecabe* and *Zizina otis* in the silkworm *Bombyx mori*.Tableau IV. Site de l'infestation par les spores de microsporidiens isolés sur *Eurema hecabe* et *Zizina otis* chez le ver à soie *Bombyx mori*.Strain / Souche : NB₄D₂

Tissues	Microsporidian <i>Microsporidien</i>		
	from / de <i>Eurema hecabe</i>	from / de <i>Zizina otis</i>	<i>Nosema bombycis</i>
Gut epithelium <i>Epithelium de l'intestin</i>	+	+	+
Fat body / Corps gras	+	+	+
Malpighian tube / Tube de Malpighi	+	+	+
Silk gland / Glande séricigène	+	+	+
Integument / Tégument	+	--	+
Tracheae / Trachée	+	--	+
Ovary / Ovaire	+	--	+
Testis / Testicule	+	--	+

+ Infection / Infestation. -- No infection / pas d'infestation.

Table V. Infectivity of microsporidian isolated from *E. hecabe* in the silkworm *B. mori*.Tableau V. Infectiosité du microsporidien isolé sur *E. hecabe* chez le ver à soie *B. mori*.Strain / Souche : NB₄D₂

Microsporidian / source	Larval mortality due to microsporidian infection (%)	Pupal mortality due to microsporidian infection (%)	% of infected moths
Microsporidien / source	Mortalité larvaire due à l'infestation par les microsporidiens (%)	Mortalité nymphale provoquée par l'infestation des microsporidiens (%)	% de papillons infestés
<i>Eurema hecabe</i>	10.25 ± 1.84	23.69 ± 1.61	84.70 ± 3.88
<i>Nosema bombycis</i>	65.25 ± 4.16	41.50 ± 4.52	100 ± 0.00
CD (P ≤ 0.05)	2.26	2.72	2.11

Table VI. Infectivity of microsporidian isolated from *Z. otis* in the silkworm *B. mori*.Tableau VI. Infectiosité des microsporidiens isolés sur *Z. otis* chez le ver à soie *B. mori*.Strain / Souche : NB₄D₂

Microsporidian / source	Larval mortality due to microsporidian infection (%)	Pupal mortality due to microsporidian infection (%)	% of infected moths
Microsporidien / source	Mortalité larvaire due à l'infestation par les microsporidiens (%)	Mortalité nymphale due à l'infestation par les microsporidiens (%)	% de papillons infestés
<i>Zizina otis</i>	2.75 ± 1.84	4.60 ± 1.97	43.39 ± 2.65
<i>Nosema bombycis</i>	65.75 ± 4.87	44.79 ± 5.41	100 ± 0.00
CD (P ≤ 0.05)	2.79	3.26	1.44

Table VII. Assay on transovarian transmission of microsporidia isolated from *E. hecabe* and *Z. otis* at different inoculum loads in silkworm

Tableau VII. Mesure de la transmission transovarienne des microsporidies isolées sur E. hecabe et Z. otis avec différentes charges d'inoculum chez le ver à soie.

Strain / Souche : NB₄D₂

Microsporidian isolated from:	Inoculum concentration per ml	No. of dead eggs	Infected dead eggs (%)	No. of larvae hatched	Infected larvae (%)	Transmission rate (%)
<i>Microsporidiens isolés sur:</i>	<i>Concentration de l'inoculum par ml</i>	<i>Nbre d'œufs morts</i>	<i>Œufs infestés morts (%)</i>	<i>Nbre de larves écloses</i>	<i>% de larves infestées</i>	<i>Taux de transmission (%)</i>
<i>Eurema hecabe</i>	1×10^5	25.6 ± 04.6	0.0 ± 0.0	425.4 ± 08.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	1×10^6	67.6 ± 11.6	9.2 ± 2.3	380.8 ± 07.4	5.8 ± 0.8	6.3 ± 1.1
	1×10^7	70.4 ± 08.4	9.6 ± 1.7	371.6 ± 19.3	6.0 ± 0.7	6.6 ± 0.9
<i>Zizina otis</i>	1×10^5	20.0 ± 01.6	0.0 ± 0.0	422.6 ± 10.9	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.0
	1×10^6	23.4 ± 04.4	0.0 ± 0.0	427.6 ± 12.3	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.0
	1×10^7	25.6 ± 04.7	0.0 ± 0.0	420.0 ± 10.1	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.0

Table VIII. Assay on transovarial transmission of microsporidia isolated from *Eurema hecabe* and *Zizina otis* in PM and NB₄D₂ in comparison to *Nosema bombycis*.

Tableau VIII. Mesure de la transmission transovarienne des microsporidies isolées sur Eurema hecabe et Zizina otis chez PM et NB₄D₂ par comparaison à Nosema bombycis.

Inoculum load / Charge de l'inoculum : 1×10^6 spore/mL

Microsporidian / source	Strain	No. of dead eggs	Infected dead eggs (%)	No. of larvae hatched	Infected larvae (%)	Transmission rate (%)
<i>Microsporidie / source</i>	<i>Souche</i>	<i>Nbre d'œufs morts</i>	<i>Œufs morts infestés (%)</i>	<i>Nbre de larves écloses</i>	<i>Nbre de larves infestées (%)</i>	<i>Taux de transmission (%)</i>
<i>Nosema bombycis</i>	NB ₄ D ₂	284.0 ± 07.9	100 ± 0.0	154.0 ± 19.3	100 ± 0.0	100 ± 0.0
	PM	204.8 ± 12.2	100 ± 0.0	136.4 ± 16.2	100 ± 0.0	100 ± 0.0
Isolated from / Isolé sur :						
<i>Eurema hecabe</i>	NB ₄ D ₂	067.6 ± 11.6	9.2 ± 2.3	380.8 ± 07.4	5.8 ± 0.8	6.3 ± 1.1
	PM	026.8 ± 06.8	7.3 ± 1.5	331.8 ± 13.9	3.8 ± 0.8	4.1 ± 0.7
<i>Zizina otis</i>	NB ₄ D ₂	018.4 ± 03.9	0.0 ± 0.0	421.0 ± 28.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	PM	017.2 ± 01.9	0.0 ± 0.0	331.4 ± 09.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

DISCUSSION

Microsporidia are among the common pathogens found infecting insects under natural field conditions (Steinhaus, 1949, 1954). Alternative hosts in the ecosystem and cross infectivity have an important roll in persistence, dispersal and transmission of microsporidia. Insects found in and around mulberry garden have been observed to carry microsporidia which are cross infective to silkworms. For *Nosema bombycis* in addition to *Bombyx mori* 20 different lepidopteron were reported as hosts (Machay, 1957). Microsporidia were also isolated from different insects such as *Tribolium sp.* (Fisher and Sanborn, 1962), *Pieris rapae crucivora* (Abe and Kawarabata, 1988), *Catopsillia pyranthe*, *C. pomonae*, *C. crocale* (Kishore *et al.*, 1994). Microsporidia were also isolated from *Pieris rapae* and *Telchinia violae*, (Samson *et al.*, 1999a, 1999b) and reported to be infective to silkworm. Out of the four types of microsporidian isolates of *P. rapae crucivora*, one type was identified as *N. bombycis* (Abe and Kawarabata, 1988). The lawn grass cut worm, *Spodotera depravata* serves as natural reservoir of *Nosema sp.* and its infection to *Bombyx mori* is systemic and results in transovarial transmission, but it is less virulent than *Nosema bombycis* (Iwano and Ishihara, 1991). A strain of *N. bombycis* causes high larval mortality of beet armyworm *Spodoptera exigua* (Yasunaga *et al.*, 1992). *N. mesnili* isolated from *Pieris rapae* when inoculated to *Bombyx mori* develops in muscles, silk glands and malpighian tubules and advances gradually to other tissues (Watanabe 1974). *Nosema* from the saturniid *Antheraea mylitta*, cross infects *Bombyx mori* in the laboratory (Patil, 1989). In the present study out of the insects screened, two new microsporidia was observed and isolated from Pierid, yellow butterfly, *Eurema hecabrae* and Lycaenid, Blue butterfly *Zizina otis*. While the microsporidian isolated from Pierid, yellow butterfly, *Eurema hecabrae* is morphologically similar to that of *N. bombycis*, its spore germination response and infectivity to *Bombyx mori* is comparatively less than *N. bombycis*. The microsporidian has shown a low level of transovarial transmission in silkworm *Bombyx mori*, which indicates the possibility for its persistence, dispersal and transmission in silkworm which is not its natural host. Whereas, the microsporidian isolated from Lycaenid, Blue butterfly *Zizina otis* is infective to *B. mori*, but is not transovarially transmitted. The transovarial transmission rate of microsporidian isolated from *E. hecabrae* was more in bivoltine strain NB4D2 as compared to multivoltine strain PM. The infection in silkworm due to both the new microsporidia is chronic, resulting in less mortality due to infection in larval and pupal stages as compared to *N. bombycis* infection where larval and pupal mortality was high. Maddox (1973) observed that closely related microsporidia might occur in the same locality, but occurrence of high microsporidiosis infection in one host and lower infections in another may be due to host behavioral differences.

In Sericultural tracts, the microsporidian infected butterflies may act as natural reservoirs, particularly, if the microsporidian is infective, pathogenic and transovarially transmitted in silkworms. It is therefore essential to control the wild lepidopteron insect pests in mulberry field, not only for increasing the yield and improving the quality of mulberry leaves, but also to prevent the occurrence of microsporidiosis in silkworm, which cause loss in cocoon yield.

REFERENCES

- ABE, Y. & KAWARABATA, T. (1988) On the microsporidian isolates derived from the cabbage worm, *Pieris rapae crucivora*. J. Seric. Sci. Jpn., 57: 147-150
- BALBIANI, E.G. (1882) Sur les microsporidies ou psorospermies des Articulés. Compt. Rend. Acad. Sci., Paris, 95: 1168-1171
- CHANG, T.C. (1973) General parasitology. Acad. Press, New York, p.272
- FISHER F.M. JR & SANBORN, R.C. (1964) *Nosema* as a source of Juvenile hormone in parasitized insects. Biol. Bull., 126(2): 235-252
- FUJIWARA, T. (1980) Three Microsporidians (*Nosema sp.*) from Silkworm *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan. 49 (3) : 229-236.

- FUJIWARA, T. (1984a) A *pleistophora* like microsporidians isolated from the silkworm *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan. 53 : 398-402.
- FUJIWARA, T. (1984b). *Thelophania* sp. (Microsporida: Thelohaniidae) isolated from Silkworm *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Japan. 53 : 459 - 460.
- FUJIWARA, T. (1985). Microsporidia from silkworm moths in egg-production sericulture. J. Seric. Sci. Japan. 54 : 108 - 111.
- HAN, M. and WATANABE, H. (1988) Transovarial transmission of two microsporidia in the silkworm, *Bombyx mori* and disease occurring in the progeny population. J. Invertebr. pathol., 51: 40-45.
- IWANO, H. and ISHIHARA, R. (1991) Isolation of *Nosema bombycis* from moths of the lawn grass cutworm, *Spodoptera depravata* butler. J. Seric. Sci. Jpn., 60: 279-287
- KAWARABATA, T. (2003) Biology of microsporidia infecting the silkworm, *Bombyx mori*, in Japan. Journal of Insect Biotechnology and Sericology, 72: 1-32.
- KISHORE, S., BAIG, M., NATARAJU, B., BALAVENKATASUBBAIAH, M., SIVAPRASAD, V., IYENGAR, M. N. S., and DATTA, R.K. (1994) Cross infectivity of microsporidia isolated from wild lepidopterous insects to silkworm, *Bombyx mori* L. Indian J. Seric., 33(2): 126-130
- LABBE, A. (1899) Sporozoa. In Das Tierreich (O. Butschli, ed.), p. 180
- MACHAY, M.L. (1957) Occurrence of the *Nosema bombycis* among wild Lepidoptera. Folia Entomol. Hungarica, 10: 359-363
- MADDOX, J. V. (1973) The persistence of the microsporidia in the environment. Entomol. Soc. Am., 9: 99-104
- NAEGELI, A. (1857). Ueber die neue krankheit der seidenraupe and verwandte organismen. Bot. Zt. 15: 760-761.
- NATARAJU, B., BALAVENKATASUBBAIAH, M., SHARMA, S.D., SUDHAKARA RAO, P., SELVAKUMAR, T., CHANDRASEKHARAN, K., THIAGARAJAN, V. & DANDIN, S.B. (2003). A technology for evaluation of chemicals/product formulations in management of silkworm diseases. In Advances in Tropical Sericulture, Pro. Natl. Con. on Tropical Sericulture for global competitiveness, NASSI, Bangalore, India. p. 359-366
- OHSHIMA, K. (1937) On the function of the polar filament of *Nosema bombycis*. Parasitology, 29: 220-224
- PASTEUR, L. (1870). Etudes sur la maladie des vers a soie. Tome-I, p.322, Tome-II, p.327. Gauthier – Villars, Imprimeur – Libraire, Paris.
- PATIL, C.S. (1989) Entomon, 14 (3 & 4): 11-14
- SAMSON, M.V., SANTHA, P.C., SINGH, R.N. & SASIDHARAN, T.O. (1999a). A new microsporidian infecting *Bombyx mori* L. Indian Silk, 37 (10): 10-12
- SAMSON, M.V., SANTHA, P.C., SINGH, R.N. and SASIDHARAN, T.O. (1999b). Microsporidian spore isolated from *Pieris* sp. Indian Silk, 38 (7): 5-8
- SATO, R. and WATANABE, H. (1980). Purification of mature microsporidian spores by isodensity equilibrium centrifugation. J. Seric. Sci. Jpn., 49: 512-516
- SATO, R. and WATANABE, H. (1985). Sporogonial sequence in microsporididae pathogenic to the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 55: 10-16
- STEINHAUS, E. A. (1949). Principles of insect pathology. McGraw Hill publications, New York, p. 546-632
- STEINHAUS, E. A. (1954). The effect of disease on insect population. Hilgardia, 23: 193-216
- UNDEEN, A. H. and AVERY, S. W. (1984). Germination of experimentally nontransmissible microsporidia. J. Invertebr. pathol., 43: 299-301.
- WATANABE, H. (1974). First report of microsporidian infection of the cabbage worm, *Pieris rapae curcivora* Boisdual (Lepidopteron: Pieridae) in Japan. Appl. Entomol. Zool., 9: 133-142
- YASUNAGA, C., FUNAKOSHI, M., KAWARABATA, T., ARATAKE, Y. and IWANO, H. (1992). Isolation and characterization of *Nosema bombycis* (Microsporida: Nosematidae) from larvae of beet armyworm, *Spodoptera exiqua*. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool., 36: 127-134
- YUP-LIAN, L. (1995). Silkworm diseases (translated by Liu Fu-an) Oxford & IBH Publishing Co.Pvt. Ltd. New Delhi, 4: 47-55

NOUVELLES MICROSPORIDIES ENTRAINANT UNE INFESTATION CHEZ LE VER A SOIE *BOMBYX MORI* L.

A. G. K. DANIEL, R. N. SINGH, S. S. SINDAGI & C. K. KAMBLE

Silkworm Seed Technology Laboratory, Carmelaram post, Kodathi, Bangalore – 560 035, Inde.

*La microsporidiose ou la maladie de la pébrine est une maladie redoutable du ver à soie **Bombyx mori** qui entraîne de grandes pertes de rendement en cocons. En sériciculture, les papillons sauvages infestés pourraient servir de réservoirs naturels à des microsporidiens infectieux pour le ver à soie. Dans cette étude, nous avons recueilli différents insectes pestes du mûrier / papillons sauvages dans les zones sérícicoles du Karnataka et les avons évalués par rapport à la présence de microsporidies. Nous avons observé deux nouvelles microsporidies et les avons isolées sur le papillon jaune de la Piéride **Eurema hecabe** et sur le papillon bleu Lycaénide, **Zizina otis** et nous avons étudié l'infectiosité et le degré de pathogénicité des nouvelles microsporidies pour le ver à soie **Bombyx mori**. Les deux microsporidies s'avèrent infectieuses pour le ver à soie **Bombyx mori**, mais seule la microsporidie isolée sur **Eurema hecabe** présente une transmission transovarienne chez le ver à soie.*

INTRODUCTION

On pense depuis longtemps que la microsporidiose ou la pébrine est provoquée par un microsporidien très virulent, *Nosema bombycis* Naegeli. Quand la pandémie de pébrine s'est produite dans le sud de la France en 1845, elle a attiré l'attention des scientifiques en Europe. Pasteur (1870) a trouvé l'agent responsable de la pébrine. Balbiani (1882) a classé les microsporidies dans le groupe des Sporozoa. Labbe (1899) a établi une liste d'une famille (Nosematidae), de trois genres (*Nosema*, *Pleistophora* et *Thelohania*), de 33 espèces nommées et de 20 espèces non nommées de microsporidies. A l'heure actuelle, il existe 143 genres de microsporidies et il est difficile de s'assurer du nombre exact d'espèces de microsporidies décrites, que l'on estime être compris entre 900 et 1300 (Kawarabata, 2003). La microsporidiose diffère des autres maladies du ver à soie, et elle est transmise à la fois horizontalement et verticalement. La transmission horizontale se produit par l'alimentation avec des feuilles contaminées et la transmission verticale par les œufs infestés (Chang 1973, Yü-p'ian, 1995). On sait aussi que d'autres pestes du mûrier et des lépidoptères sauvages abritent des microsporidies ; on a trouvé plus de soixante insectes sauvages qui ont des spores microsporidiennes et environ vingt d'entre elles peuvent infester le ver à soie de manière croisée (Kawarabata, 2003).

L'incidence perpétuelle de l'infestation par les microsporidiens chez le ver à soie pourrait être due à des sources variées de contamination secondaire y compris à des hôtes alternés dans et autour de la muraille. En plus de *Nosema bombycis*, on a isolé sept autres microsporidies appartenant aux genres *Nosema*, *Pleistophora* et *Thelohania* sur le papillon du ver à soie. Ces microsporidiens diffèrent dans leur morphologie, dans leurs tissus cibles et dans leur virulence et à titre d'essai on les a désignés, M11, M12 et M14 (*Nosema* sp.) ; M24, M25 et M27 (*Pleistophora* sp.) et M32 (*Thelohania* sp.) (Fujiwara, 1980 & 1984a, b & 1985). Dernièrement, on a classé le type M12 sous le genre *Vairimorpha*, puisqu'il diffère des types *Nosema* en raison du type octospore de sa sporogonie (Sato et Watanabe, 1985). Nous avons réalisé cette étude dans le but d'évaluer des insectes parasites du mûrier / des papillons sauvages par rapport à de nouvelles microsporidies et d'étudier l'infectiosité et le degré de pathogénicité chez le ver à soie *Bombyx mori* des microsporidies isolées. Deux nouvelles

microsporidies ont été observées et isolées sur le papillon jaune de la piéride, *Eurema hecabe* et le papillon bleu *Lycanide*, *Zizina otis*.

MATERIELS ET METHODES

i) Recueil et évaluation des insectes :

On recueille différents insectes parasites et papillons sauvages dans et autour des terrains de la muraie dans les zones de grainage du Karnataka (polyvoltin et bivoltin). De plus, on recueille des insectes parasites au hasard dans différentes zones séricicoles du sud de l'Inde. On recueille aussi les insectes des cultures avoisinant la muraie. On examine les insectes recueillis par rapport à la présence de microsporidies. On homogénéise les insectes individuellement dans 0,6 % de solution de K_2CO_3 , on les filtre, on les centrifuge à $1500 \times g$ pendant 3 minutes. On examine le dépôt sous un microscope à contraste de phase.

ii) Observations morphologiques des microsporidies isolées sur les papillons :

On purifie par centrifugation différentielle les microsporidies isolées, suivie par une purification en gradient à haute densité en utilisant du Percoll® (Sato et Watanabe, 1980) et on enregistre les caractéristiques morphologiques des microsporidies et on les compare à *Nosema bombycis* Naegeli (1857).

iii) Germination des microsporidies isolées sur les papillons :

On étudie la réponse de germination des nouvelles microsporidies et on la compare avec la souche standard de *N. bombycis* en suivant la méthode de neutralisation (Ohshima, 1937). On incube les spores fraîchement purifiées des nouvelles microsporidies et les spores de *N. bombycis* pendant 30 min. avec différentes concentrations de solution de KOH (0,1 N; 0,1 % ; 0,2 % ; 0,3 % ; 0,4 % ; 0,5 % ; 0,6 % ; 0,7 % et 0,8 %). On neutralise les échantillons traités après incubation avec du PBS (solution saline au tampon de phosphate, pH 6,8) et on les observe pour la germination des spores sous un microscope à contraste de phase. Les spores qui ont germé apparaissent noires sous le microscope à contraste de phase et on observe de fins filaments polaires qui sortent de la spore avec un sporoplasme rond à leurs extrémités. On calcule le % de germination en utilisant une méthode proposée par Undeen et Avery (1984).

iv) Infectiosité et pathogénicité pour le ver à soie des microsporidies isolées sur les papillons :

On purifie le microsporidien isolé sur *Eurema hecabe* et *Zizina otis* et on l'inocule chez les larves du ver à soie (chez des stocks exempts de maladie maintenus au laboratoire, souche NB4D2) après la 2^{ème} mue (3^{ème} âge, 1^{er} jour), avec 10^7 spores /ml en suivant la méthode d'inoculation habituelle (Nataraju et coll., 2003). On évalue le site de l'infestation dans les tissus des larves après le 10^{ème} jour d'inoculation et on le compare avec la souche standard de *N. bombycis*.

Dans la deuxième partie de l'expérience, on inocule les microsporidies isolées sur les papillons chez les larves de ver à soie (souche NB4D2, 40 larves par répétition, 10 répétitions) après la 2^{ème} mue (3^{ème} âge, 1^{er} jour) avec 10^7 spores / ml pour évaluer le niveau d'infestation aux stades larvaire, nymphal et papillon. On maintient aussi un lot inoculé avec *N. bombycis* à titre de comparaison.

v) Mesure de la transmission transovarienne des microsporidies chez les souches de ver à soie NB4D2 et PM :

On a étudié la transmission transovarienne des deux microsporidies en utilisant NB4D2 comme souche test. On inocule les larves après la 3^{ème} mue (1^{er} jour du 4^{ème} âge) avec différentes charges d'inoculum (1×10^5 , 1×10^6 et 1×10^7 spores / ml) et on les laisse filer leurs cocons et émerger. On prépare des pontes à partir des papillons infestés. On évalue cinq pontes infestées, chacune d'elles

représentant une répétition, pour savoir si elles sont infestées aux stades de l'œuf et de la larve. On incube et on lève les œufs. On teste tous les œufs morts pour savoir s'ils sont infestés. On sélectionne cent jeunes larves après la 1^{ère} mue, de manière aléatoire, sur chaque répétition et on les examine pour savoir si elles sont infestées.

Dans la deuxième partie de l'expérience, on inocule aussi les microsporidies isolées sur les papillons d'une façon similaire en utilisant 1×10^6 spores / ml par charge d'inoculum aux larves de vers à soie des souches PM (polyvoltine) et NB4D2 (bivoltine) après la 3^{ème} mue (1^{er} jour du 4^{ème} âge) et on compare le taux de transmission transovarienne chez ces souches. On maintient aussi un lot inoculé avec *Nosema bombycis* à titre de comparaison. On calcule le taux de transmission transovarienne avec la formule standard $[(A \times B) + (C \times D)] / A + C$ (A : nbre d'œufs morts, B : % d'œufs morts infestés, C : nbre de larves écloses, D : % de larves infestées) proposée par Han et Watanabe (1988).

RESULTATS

i) Recueil et examen des insectes :

Dans cette étude, on recueille et on examine un ensemble de 7767 spécimens d'insectes appartenant à différents ordres (Lépidoptères, Homoptères, Coléoptères et Orthoptères) par rapport à la présence de microsporidies. On observe et on isole deux microsporidies du papillon jaune de la Piéride, *Eurema hecabe* et du papillon bleu Lycaenide, *Zizina otis* (Tableau I). On purifie les microsporidies isolées par une centrifugation répétée comprenant une centrifugation en gradient de Percoll et on les utilise pour des études supplémentaires.

ii) Observations morphologiques des deux nouvelles microsporidies isolées sur les papillons (*Eurema hecabe* et *Zizina otis*) :

La longueur et la largeur des spores de microsporidies isolées sur *Eurema hecabe* est presque identique aux spores de *Nosema bombycis* tandis que dans le cas des spores des microsporidiens isolés sur *Zizina otis*, on observe que leur longueur est plus importante que celle des spores de *N. bombycis* (Tableau II).

iii) Réponse de germination des microsporidies isolées (*Eurema hecabe* et *Zizina otis*) :

Les spores de *N. bombycis* présentent plus de 90 % de germination à toutes les concentrations de KOH. Les microsporidies d'*Eurema hecabe* présentent moins de 50 % de germination à une concentration de KOH de 0,1 N à 0,3 %, tandis que les microsporidiens isolés sur *Zizina otis* présentent une germination seulement à des concentrations de KOH entre 0,6 et 0,8 % (Tableau III).

iv) Infectiosité et pathogénicité des microsporidies isolées (*Eurema hecabe* et *Zizina otis*) pour le ver à soie :

Les deux microsporidies isolées sur les papillons s'avèrent infectieuses pour les larves du ver à soie. Dans le cas des microsporidies de *Zizina otis*, on n'observe l'infestation que dans l'intestin, le corps gras, le tube de Malpighi et dans la glande séricigène au bout de 10 jours (Tableau IV). Avec les deux nouvelles microsporidies isolées, on observe que l'infestation au stade du papillon est moins importante chez *Eurema hecabe* (84,7 %) et chez *Zizina otis* (43,39 %) par comparaison à *N. bombycis*, où on observe 100 % d'infestation (Tableaux V et VI).

v) Mesure de la transmission transovarienne des microsporidies isolées sur *E. hecabe* et *Z. otis* chez les souches de ver à soie NB4D2 et PM :

Les résultats sont présentés dans les Tableaux VII et VIII. Dans le cas des microsporidiens d'*Eurema hecabe*, le taux de transmission est de $6,3 \pm 1,1$ % et de $6,6 \pm 0,9$ % à respectivement 1×10^6 et 1×10^7 spores / ml de charge d'inoculum. On n'enregistre aucune transmission à 1×10^5

spores / ml, le taux de transmission est de $4,1 \pm 0,7$ % chez PM par comparaison à $6,3 \pm 1,1$ % chez NB4D2. Dans le cas des microsporidiens de *Zizina otis*, on ne remarque aucune transmission transovarienne avec aucune catégorie d'inoculation. Le lot inoculé avec *Nosema bombycis* présente 100 % de transmission transovarienne à la fois chez la souche NB4D2 et la souche PM.

DISCUSSION

Les microsporidies font partie des pathogènes courants qui infestent les insectes dans les conditions naturelles sur le terrain (Steinhaus, 1949, 1954). Les hôtes alternatifs de l'écosystème et l'infectiosité croisée jouent un rôle important dans la persistance, la dispersion et la transmission des microsporidies. On constate que les insectes que l'on trouve dans et autour de la muraie portent des microsporidiens qui sont infectieux de manière croisée pour le ver à soie.

En plus de *Bombyx mori*, il a été rapporté que 20 différents lépidoptères étaient hôtes de *Nosema bombycis*, (Machay, 1957). On a aussi isolé des microsporidies de différents insectes tels que *Tribolium* sp. (Fisher et Sanborn, 1962), *Pieris rapae crucivora* (Abe et Kawarabata, 1988), *Catopsillia pyranthe*, *C. pomonae*, *C. crocale* (Kishore et coll., 1994). On a aussi isolé des microsporidies sur *Pieris rapae* et *Telchinia violae* (Samson et coll., 1999a, 1999b) et rapporté qu'elles sont infectieuses pour le ver à soie. Sur les quatre types d'isolats de microsporidies de *P. rapae crucivora*, on a identifié un type en tant que *N. bombycis* (Abe et Kawarabata, 1998). Le ver du gazon coupé *Spodopera depravata* sert de réservoir naturel à *Nosema* sp. et son infestation est systémique pour *Bombyx mori* et entraîne la transmission transovarienne mais il est moins virulent que *Nosema bombycis* (Iwano et Ishihara, 1991). Une souche de *N. bombycis* entraîne une mortalité larvaire élevée chez la chenille de la leucanie *Spodoptera exigua* (Yasunaga et coll., 1992). Quand on l'inocule à *Bombyx mori*, *N. mesnilie* isolé sur *Pieris rapae*, se développe dans les muscles, dans les glandes séricigènes et dans les tubes de Malpighi et avance progressivement vers d'autres tissus (Watanabe, 1974). Le *Nosema* du saturnidé *Antheraea mylitta* infeste de manière croisée *Bombyx mori* en laboratoire (Patil, 1989). Dans cette étude, on a observé deux nouvelles microsporidies et on les a isolées du papillon jaune de la piéride, *Eurema hecabae* et du papillon bleu Lycaenide *Zizina otis*. Tandis que le microsporidien isolé du papillon de la piéride, *Eurema hecabae*, est morphologiquement semblable à celui de *N. bombycis*, la réponse de germination de ses spores et son infectiosité envers *Bombyx mori* sont comparativement moins importantes que celles de *N. bombycis*. Le microsporidien présente un faible niveau de transmission transovarienne chez le ver à soie *Bombyx mori*, ce qui montre la possibilité de sa persistance, de sa dispersion et de sa transmission chez le ver à soie, qui n'est pas son hôte naturel. Tandis que le microsporidien isolé du papillon bleu Lycaenide *Zizina otis* est infectieux pour *B. mori* mais n'est pas transmis de manière transovarienne. Le taux de transmission transovarienne du microsporidien isolé de la piéride *E. hecabae* est plus important chez la souche bivoltine NB4D2 que chez la souche polyvoltine PM. L'infestation chez le ver à soie provoquée par les deux nouvelles microsporidies est chronique, elle entraîne moins de mortalité aux stades larvaire et nymphal que l'infestation par *N. bombycis* avec laquelle la mortalité larvaire et nymphale est élevée. Maddox (1973) a observé que des microsporidies étroitement apparentées peuvent se produire dans la même localité et que lorsqu'une infestation importante de microsporidiose se produit chez un hôte et des infestations moins importantes chez un autre, cela pourrait être dû à des différences de comportement de l'hôte.

Dans les zones séricicoles, les papillons infestés par les microsporidies pourraient servir de réservoirs naturels, en particulier, si le microsporidien est infectieux, pathogène et transmis de manière transovarienne aux vers à soie. Il est donc essentiel de lutter contre les insectes lépidoptères sauvages des muriers, non seulement pour augmenter le rendement et la qualité des feuilles de mûrier mais aussi pour prévenir la microsporidiose chez le ver à soie, qui entraîne des pertes de rendement en cocons.

GENETIC IDENTIFICATION OF ECONOMIC CHARACTERS IN IRANIAN NATIVE SILKWORM GROUP

M. MAVVAJPOUR, S.Z. MIRHOSSEINI, M. GHANIPOUR

Iran Silkworm Research Center, P. O. Box 41635-3479, Rasht - Guilan, Iran.

In order to identify genetic potential of Iranian native silkworm groups (Baghdad, Guilan, Khorasan Lemon, Khorasan Orange and Khorasan Pink), after forming different families in each group during four generations, using individual characteristics of cocoon and reproduction characters including single cocoon weight, shell weight, shell ratio, fecundity, fertility and hatchability, genetic parameters (heritability and correlation coefficients) were estimated. Mean analysis of studied traits shows that Khorasan Lemon group has a low productivity and improving performance of this group is difficult. Mean performance of reproduction traits in Baghdad and Khorasan Orange groups was significantly higher than other groups. A high heritability value was obtained for cocoon weight, shell weight and hatchability, while lower heritability was recorded for fecundity and fertility, probably because of decreasing genetic variation through natural selection. Genetic correlation analysis shows that selection on cocoon weight and shell weight in several generations may cause increase of fecundity and decrease of fertility and hatchability. The high heritability of some traits shows the positive perspective in improving productivity of Iranian native silkworm and using it in commercial level.

INTRODUCTION

Precise information about the available genetic potential of any species is the basis of breeding project planning (Ashoka and Govindan, 1990; Singh *et al.*, 1998). Subsequent definition of breeding aims, of genetic variation (as basis for selection and genetic improvement) and relations among different characters are essential. The value of heritability is derived from population and environment. Therefore, the heritability of a population may vary from one place or one season to another. On the other hand when more than one character is considered in a breeding project, information about the genetic correlation is very important (Anonymous, 1996; Gowda *et al.*, 1989).

The first step for hybrid silkworm egg production is to isolate pure lines from local silkworm races and/or from imported hybrids (Kasiviswanathan, 1976). Rearing of hybrid silkworm eggs compared to local varieties resulted in increasing of rearing performances for almost all economic characters remarkably. However, the local varieties should not be given up.

The presence of local varieties provides a unique valuable genetic resource, which greatly helps the breeding experts in preparing time-dependent adopted breeding projects according to the progressive requirements of beneficiaries.

The object of this study is to identify the genetic potentialities of Iranian native silkworm groups.

MATERIALS AND METHODS

10 egg layings from each 5 Iranian native silkworm groups named Baghdad, Guilan, Khorasan (Kh) Lemon, Khorasan Orange and Khorasan Pink have been used as base generation for spring

rearing season. From harvested cocoons of each group, 80 female and 80 male cocoons were randomly separated and individually evaluated for single cocoon weight and shell weight.

Regarding these two characters 12 females and 12 males with higher performances were selected for production of the first generation. This resulted in creating 12 families for each native group, which in the same way, continued for 4 generations within 2 years of this study. The selected families have undergone batch rearing and in 4th generation in order to measure the reproductive traits (fecundity, fertility and hatching %) individually, all selected individuals (25 females and 25 males) in each family were crossed randomly (ESCAP, 1993).

Generated linear model of statistical Analysis software (SAS) for statistical analysis and Duncan and Tukey test at $P < 0.05$ for mean comparison were used. Considering same rearing conditions for all groups and in order to estimate the genetically parameters in each native silkworm group and in all groups the following statistical models were used:

$$y_{ijkl} = \mu_i + S_{ij} + G_{ik} + A_{ijkl} + e_{ijkl}$$

$$y_{ijklm} = \mu_i + S_{ij} + G_{ik} + V_{il} + A_{ijklm} + e_{ijklm}$$

In which

y = Animal record

μ_i = mean of i trait

S_{ij} = effect of j sex on i trait

G_{ik} = effect of k generation on i trait

V_{il} = effect of l group on i trait

A = animal additive genes value

e = residual effects

In these models the effects of sex, generation and group are considered as constant and additive genes, value of animal is determined randomly, variance and covariance component of these models for cocoon weight, cocoon shell weight, shell ratio, fecundity, egg fertility and hatchability were estimated by restricted maximum likelihood (REML) method using derivative-free algorithm in animal model based on full sib data, additive genetic correlation and heritability coefficients.

For this purpose POWELL procedure of DXMUX program from DFREML (1983) software with 10^{-8} convergence was implemented.

RESULTS AND DISCUSSION

The mean values for single cocoon weight, cocoon shell weight, shell ratio, fecundity, fertilizing rate and hatchability rate for 5 groups are summarised in Table I. Accordingly the larvae of Guilan and Khorasan Lemon groups showed the highest and lowest single cocoon weight (1.722g and 1.617g respectively), while there was no significant difference between Khorasan Orange and Pink groups. Khorasan Pink and Lemon with 0.318g and 0.236g showed the highest and lowest cocoon shell weight as well as cocoon shell ratio with 19.41% and 14.71% respectively. The highest and the lowest number of eggs per moth belong to Khorasan Orange and Pink with 511.98 and 403.8 respectively. The highest average of egg fertility obtained from Khorasan Orange (92.01%) while the Khorasan Lemon showed the lowest value (81.55) for this trait as well as lowest percentage of eggs hatchability (76.22%). Guilan group showed the highest rate of egg hatching (87.86%). The analysis of mean values for the studied characters shows the low production power in Khorasan Lemon which makes the breeding improvement very difficult.

Table I. Mean values of studied characters in Iran native silkworm groups.

Tableau I. Valeurs moyennes des caractères étudiés chez les groupes de vers à soie originaires d'Iran.

Character	Cocoon weight (g) Mean $\pm$ SE	Cocoon shell weight (g) Mean $\pm$ SE	Cocoon shell rate (%) Mean $\pm$ SE	Fecundity Mean $\pm$ SE	Fertility (%) Mean $\pm$ SE	Hatchability (%) Mean $\pm$ SE
Caractère	Poids du cocon (g) Moyenne $\pm$ Ecart type	Poids de la coque soyeuse (g) Moyenne $\pm$ Ecart type	Richesse soyeuse (%) Moyenne $\pm$ Ecart type	Fécondité Moyenne $\pm$ Ecart type	Fertilité (%) Moyenne $\pm$ Ecart type	Taux d'éclosion (%) Moyenne $\pm$ Ecart type
Baghdad	1.708 $\pm$ 0.0067 B	0.289 $\pm$ 0.0011 C	17.60 $\pm$ 0.043 C	500.84 $\pm$ 7.14 A	91.07 $\pm$ 0.54 A	87.10 $\pm$ 0.82 AB
Guilan	1.722 $\pm$ 0.0077 A	0.282 $\pm$ 0.0013 D	16.41 $\pm$ 0.043 D	500.94 $\pm$ 8.07 A	86.73 $\pm$ 1.17 B	87.86 $\pm$ 0.77 A
Khorasan Lemon	1.617 $\pm$ 0.0064 D	0.136 $\pm$ 0.0009 E	14.71 $\pm$ 0.039 E	414.25 $\pm$ 6.84 B	81.55 $\pm$ 0.9 C	76.22 $\pm$ 1.11 C
Khorasan Orange	1.640 $\pm$ 0.0069 C	0.301 $\pm$ 0.0011 B	18.50 $\pm$ 0.044 B	511.98 $\pm$ 6.25 A	92.01 $\pm$ 0.48 A	86.08 $\pm$ 0.89 AB
Khorasan Pink	1.648 $\pm$ 0.0063 C	0.318 $\pm$ 0.0011 A	19.41 $\pm$ 0.044 A	403.80 $\pm$ 8.87 B	85.05 $\pm$ 1.01 B	84.56 $\pm$ 1.21 B
All groups Tous les groupes	1.669 $\pm$ 0.0031	0.285 $\pm$ 0.00057	0.285 17.19 $\pm$ 0.025	477.35 $\pm$ 3.63	87.45 $\pm$ 0.42	84.87 $\pm$ 0.45

* Mean values with same letter have no significant differences ($P < 0.05$) / Les valeurs moyennes avec la même lettre ne présentent pas de différences importantes ($P < 0,05$).

Table II. Matrix of heritability and genetic correlation of different characters in Iran native silkworm group.

Tableau II. Matrice de l'hérédité et corrélation génétique de différents caractères chez les groupes de vers à soie originaires d'Iran.

Character	Group	Character / Caractère					
		Cocoon weight	Cocoon shell weight	Cocoon shell rate	Fecundity	Fertility	Hatchability
Caractère	Groupe	Poids du cocon	Poids de la coque	Taux de richesse soyeuse	Fécondité	Fertilité	Capacité d'éclosion
Cocoon weight (g)	Baghdad	0.3393 ± 0.074	0.8366	-0.0387	0.8678	0.2463	0.405
Poids du cocon (g)	Guilan	0.4315 ± 0.076	0.8918	0.2832	-0.2868	-0.2911	-0.3738
	Khorasan Lemon	0.3856 ± 0.08	0.7809	-0.0941	-0.7448	1	-0.2228
	Khorasan Orange	0.394 ± 0.1	0.7774	-0.4182	0.0313	-0.0284	0.0869
	Khorasan Pink	0.302 ± 0.066	0.9228	0.3825	1	-0.5886	-0.5081
	All groups	0.4508 ± 0.027	0.8537	0.1164	0.3518	-0.476	-0.2916
	Tous les groupes						
Cocoon shell	Baghdad		0.3754 ± 0.065	0.5095	0.3822	0.3654	0.8752
Poids de la coque soyeuse (g)	Guilan		0.4548 ± 0.063	0.6703	-0.1623	-0.0749	-0.1539
	Khorasan Lemon		0.3389 ± 0.088	0.5454	-0.001	-0.9858	0.0121
	Khorasan Orange		0.3704 ± 0.081	0.2383	0.0807	-0.7185	-0.0327
	Khorasan Pink		0.4928 ± 0.063	0.7039	1	-0.373	-0.2161
	All groups		0.5081 ± 0.026	0.5674	0.2134	-0.4262	-0.1271
	Tous les groupes						
Cocoon shell rate (%)	Baghdad			0.2453 ± 0.063	-0.5666	0.5722	0.9187
Richesse soyeuse (%)	Guilan			0.2927 ± 0.068	-0.202	0.2602	0.107
	Khorasan Lemon			0.2809 ± 0.096	0.5684	-1	0.7714
	Khorasan Orange			0.4104 ± 0.09	0.0088	-1	-0.2168
	Khorasan Pink			0.1917 ± 0.059	0.7519	-0.0308	0.2981
	All groups						
	Tous les groupes			0.3264 ± 0.031	-0.0496	-0.2028	0.1534
Fecundity	Baghdad				0.086 ± 0.086	-0.624	-0.1979
Fécondité	Guilan				0.0514 ± 0.086	1	-0.6496
	Khorasan Lemon				0.1213 ± 0.12	0.7517	0.4387
	Khorasan Orange				0.2549 ± 0.14	0.69	0.649
	Khorasan Pink				0.0123 ± 0.091	-1	-1
	All groups				0.1216 ± 0.045	0.1078	0.257
	Tous les groupes						
Fertility (%)	Baghdad					0.1057 ± 0.093	0.8819
Fertilité (%)	Guilan					0.0647 ± 0.1	1
	Khorasan Lemon					0.0208 ± 0.11	-1
	Khorasan Orange					0.0598 ± 0.062	0.9242
	Khorasan Pink					0.4638 ± 0.23	0.8244
	All groups / Tous les groupes					0.0874 ± 0.049	0.7913

Table II. Continued / Tableau II. Suite.

Character	Group	Character / Caractère					
		Cocoon weight	Cocoon shell weight	Cocoon shell rate	Fecundity	Fertility	Hatchability
Caractère	Groupe	Poids du cocon	Poids de la coque	Taux de richesse soyeuse	Fécondité	Fertilité	Capacité d'éclosion
Hatchability (%)	Baghdad						0.0567 ± 0.076
Capacité d'éclosion (%)	Guilan						0.1973 ± 0.18
	Khorasan Lemon						0.5412 ± 0.22
	Khorasan Orange						0.5066 ± 0.2
	Khorasan Pink						0.825 ± 0.27
	All groups						
	Tous les groupes						0.443 ± 0.091

*Heritability of characters (with standard error) are shown diagonally and genetic correlations are shown non-diagonally / L'héritabilité des caractères (avec l'écart type) est présentée de manière diagonale et les corrélations génétiques sont présentées de manière non diagonale.

All groups appeared significantly different in cocoon shell weight and ratio and showed similar trend order for these two traits. Although the trait of single cocoon weight is of high importance the rate of cocoon shell will determine the amount of production material. Therefore, in spite of same medium order for Khorasan Pink and Orange in cocoon weight, the rate of cocoon shell elevates their positions to the highest level respectively.

From the aspect of moth fecundity there were no significant difference between Khorasan Orange, Guilan and Baghdad. Khorasan Lemon and Pink also showed no difference for this trait. Evaluation of results for fecundity, fertility and hatchability indicated that the larvae of Khorasan Lemon group are very weak in reproduction performances while Baghdad and Khorasan Orange were in the highest class significantly.

The heritability and genetic correlation matrix of the studied traits for each group as well as all groups are shown in Table II. The highest and lowest values of heritability for cocoon weight, cocoon shell weight and shell ratio were observed in Guilan (0.4315) and Khorasan Pink (0.3020) groups, Khorasan Pink (0.4928) and Khorasan Lemon (0.3389) groups and Khorasan Orange (0.4104) and Khorasan Pink (0.1917) respectively. The heritability values for reproductive characters were also estimated, however, due to small numbers of records and increasing of standard error the obtained values are not of high degree of confidence.

Cocoon shell weight (0.5081) and egg fertility (0.0874) showed the highest and lowest heritability among all groups. High heritability of single cocoon weight, cocoon shell weight and hatching rate characters indicates the high effects of additive gene variation in these traits, which results in high performances of selection as well as rapid breeding improvement similar to that of other livestock, the heritability values of reproductive traits, i.e. fecundity and egg fertility in native silkworm groups are low. This probably is related to limited genetic variation for natural selection.

Therefore in order to accelerate the improvement of these traits, hybridization or back crossing with highly reproductive varieties instead of inbreeding or inter-family crossing methods are recommendable. High positive genetic correlation between single cocoons weight and cocoon shell weight (0.8537) indicates that selection on the basis of cocoon weight will greatly improve the weight of cocoon silk. The highest and lowest correlation between these two traits was observed in Khorasan Pink (0.9228) and Khorasan Orange (0.7774) groups respectively.

On the other hand, for cocoon weight and shell rate some negative or low positive correlation were observed (0.1164 in all groups). This correlation was negative in Baghdad, Kh. Lemon and Kh. Orange, while Khorasan Pink (0.3835) and Kh. Orange (-0.4182) showed the highest and lowest value. Meanwhile, a relative high genetic correlation was obtained between cocoon shell weight and shell ratio (0.5674), which the highest (0.7039) and lowest (0.2383) values presented by Khorasan Pink and Kh. Orange respectively. The higher genetic correlation values between cocoon weight, shell weight and shell rate in Kh. Pink group indicates the susceptibility of this group for synchronous improvement of cocoon characters with negligible adverse effects, while the lower correlation between cocoon traits in Kh. Orange group would make the progress of breeding programs very difficult. The obtained results from correlation analysis of cocoon traits in this study confirm the results of researches of Satenahalli (1990), Sofi (1999), Jayaswal *et al.*, (2000), Li (1992) and Kumaresan *et al.*, (2000), Rangaiah *et al.*, (1995).

The estimated values for genetic correlation between production and reproduction characters indicated a positive correlation between cocoon weight / shell weight and moth fecundity (0.3518 and 0.2134, respectively) along with negative correlation between these two cocoon traits with fertility (-0.467 and -0.4262) and hatchability (-0.2616 and -0.1271). So it is expected that selection on cocoon and shell weight during successive generations would improve fecundity of female moth and hinder the rate of egg fertility and hatching; considering the positive genetic correlation between reproduction characters, the synchronous improvement of these traits would be employed in breeding plans.

According to this study, the genetic potentialities for production and reproduction characters in Iran native groups are remarkably lower than those of Iran commercial pure lines which obstruct the economical usage of them. However, high heritability for cocoon characters as well as egg hatchability in native groups provides a hopeful prospect for their economical use via complementary breeding programs.

REFERENCES

- ANONYMOUS (1996) Primary document for development of national farm animal resources management plans. IDAD, FAO PGD-1.0.
- ASHOKA J. & GOVINDAN R. (1990) Genetic estimates for quantitative traits in bivoltine silkworm, *Bombyx mori* L. Mysore J. Agric. Sci., 24: 371-374.
- DFREML (1983) Program to estimate variance components by restricted maximum likelihood, using a derivative-free algorithm. User notes, version: 3.1.
- ESCAP (1993) Principles and techniques of silkworm breeding. United Nations, New York.
- GOWDA B. L. V., NARAYANASWAMY T. K., MUNIRAJAPPA R. (1989) Impact of pupal weight on growth and development of the following generation in the silkworm Indian race NB7 (*Bombyx mori*). Sericologia, 29: 481-489.
- JAYASWAL K. P., MASILAMAN S., LAKSHMANAN V., SINDAGI S. S., & DATTAR K. (2000) Genetic variation, correlation and path analysis in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Sericologia, 40: 211-223.
- KASIVISWANATHAN K. (1976) Sericulture industry in Japan-Part VI, Silkworm Breeding and Genetics, Indian Silk, 14: 13-21.

- 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.
- LI W. (1992) Genetic path network among quantitative characters in *Bombyx mori* L. *Sericologia*, 32: 543-548.
- RANGAIAH S., GOVINDAN R., DEVAIAH M. C. & NARAYANASWAMY T.K. (1995) Genetic studies for some quantitative traits among multivoltine races of silkworm, *Bombyx mori* L. *Mysore J. Agric. Sci.*, 29:248-251.
- SATENAHALLI S. B., GOVINDAN R., GOUD J. V. & MAGADUM S. B. (1990) Genetic parameters and correlation coefficient analysis in silkworm, *Bombyx mori* L. *Mysore J. Agric. Sci.*, 24: 491-491-495.
- SINGH T., CHANDRASEKHARAIH & SAMSON M. V. (1998) Correlation and heritability analysis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Sericologia*, 38: 1-13.
- SOFI A. M., MASOODI M. A. & KAMALI A. S. (1999) Estimation of heritability and correlation of some quantitative traits in line $\times$ tester analysis in silkworm, *Bombyx mori* L. *Mysore J. Agric. Sci.*, 33: 289-296.

IDENTIFICATION GENETIQUE DES CARACTERES ECONOMIQUES DANS DES POPULATIONS DE VERS A SOIE ORIGINAIRES D'IRAN

M. MAVVAJPOUR, S. Z. MIRHOSSEINI & M. GHANIPOUR

Iran Silkworm Research Center, P. O. Box 41635 - 3479, Rasht - Guilan, Iran.

Nous avons estimé les paramètres génétiques, (coefficients d'héritabilité et de corrélation) pour identifier le potentiel génétique de groupes de vers à soie originaires d'Iran (Baghdad, Guilan, Khorasan Lemon, Khorasan Orange et Khorasan Pink) après avoir formé différentes familles dans chaque groupe pendant quatre générations, en utilisant les caractéristiques individuelles du cocon et les caractères de reproduction dont le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse, la fécondité, la fertilité et la capacité d'éclosion. L'analyse moyenne des caractères étudiés montre que le groupe Khorasan Lemon a une faible productivité et qu'il est difficile d'améliorer la performance de ce groupe. La performance moyenne des caractères de reproduction pour les groupes de Baghdad et de Khorasan Orange est considérablement plus élevée que celle des autres groupes. On obtient une valeur d'héritabilité élevée pour le poids du cocon, le poids de la coque et la capacité d'éclosion tandis qu'on enregistre une héritabilité plus faible pour la fécondité et la fertilité, probablement à cause de la variation génétique qui diminue avec la sélection naturelle. L'analyse de corrélation génétique montre que la sélection sur le poids du cocon et sur le poids de la coque pendant plusieurs générations pourrait augmenter la fécondité et diminuer la fertilité et la capacité d'éclosion. L'héritabilité élevée de certains caractères renferme des perspectives positives pour l'amélioration de la productivité du ver à soie originaire d'Iran et pour son utilisation sur le plan commercial.

INTRODUCTION

Il est essentiel d'avoir des informations précises sur le potentiel génétique disponible de chaque espèce pour mettre au point des projets de lignage (Ashoka et Govindan, 1990 ; Singh et coll., 1998). Ensuite, il est essentiel de définir les objectifs du lignage, la variation génétique (comme base de la sélection et de l'amélioration génétique) et les relations entre les différents caractères. On en déduit la valeur de l'héritabilité de la population et de l'environnement. L'héritabilité d'une population pourrait donc varier d'un endroit ou d'une saison à l'autre. D'autre part, quand on considère plus d'un caractère dans un projet de lignage, les informations sur la corrélation génétique sont très importantes (Anonyme, 1996 ; Gowda et coll., 1989).

La première étape pour la production d'œufs de vers à soie hybrides est d'isoler les lignées pures des races locales de vers à soie et / ou des hybrides importés (Kasiviswanathan, 1976). L'élevage de vers à soie hybrides par comparaison aux variétés locales entraîne l'augmentation remarquable des performances d'élevage pour presque tous les caractères économiques. Cependant, il ne faut pas abandonner les variétés locales.

La présence de variétés locales apporte des ressources génétiques uniques, qui aident beaucoup les experts en matière de lignage à mettre au point des projets de lignage échelonnés dans le temps selon les besoins progressifs des bénéficiaires.

L'objet de cette étude est d'identifier le potentiel génétique que renferment les groupes de vers à soie originaires d'Iran.

MATERIELS ET METHODES

On a utilisé dix pontes de 5 groupes de vers à soie originaires d'Iran appelés Baghdad, Guilan, Khorasan (Kh) Lemon, Khorasan Orange et Khorasan Pink comme génération de base pour la saison d'élevage du printemps. Parmi les cocons recueillis pour chaque groupe, on sépare au hasard 80 cocons mâles et 80 cocons femelles et on évalue individuellement le poids de leurs cocons et de leurs coques.

Pour ces deux caractères, on sélectionne 12 femelles et 12 mâles aux performances les plus élevées pour l'obtention de la première génération. Cela entraîne la création de 12 familles pour chaque groupe indigène, que l'on traite de la même façon pendant 4 générations pendant les deux années de l'étude. On soumet les familles sélectionnées à un élevage en lots et à la 4^{ème} génération on croise au hasard tous les individus sélectionnés dans chaque famille (25 femelles et 25 mâles) pour mesurer les caractères reproductifs individuellement (fécondité, fertilité et % d'éclosion) (ESCAP, 1993).

On utilise le modèle linéaire proposé par le logiciel d'Analyse statistique (SAS) pour l'analyse statistique et les tests Duncan et Tukey à $P < 0,05$ pour la comparaison des moyennes. On utilise les modèles statistiques suivants en prenant en compte les mêmes conditions d'élevage pour tous les groupes et pour estimer les paramètres génétiques de chaque groupe de vers à soie indigènes et dans tous les groupes, :

$$y_{ijkl} = \mu_i + S_{ij} + G_{ik} + A_{ijkl} + e_{ijkl}$$

$$y_{ijklm} = \mu_i + S_{ij} + G_{ik} + V_{il} + A_{ijklm} + e_{ijklm}$$

où

y = valeur pour l'animal

μ_i = moyenne du caractère i

S_{ij} = effet du sexe j sur le caractère i

G_{ik} = effet de la génération k sur le caractère i

V_{il} = effet du groupe l sur le caractère i

A = valeur des gènes additifs de l'animal

e = effets résiduels

Dans ces modèles, les effets du sexe, de la génération et du groupe sont considérés comme constants et les gènes additifs, la valeur de l'animal sont déterminés au hasard. On estime le composant de la variance et de la covariance de ces modèles pour le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse, la fécondité, la fertilité et la capacité d'éclosion des œufs par la méthode de la probabilité maximum restreinte (REML) en utilisant l'algorithme sans dérivé dans le modèle basé sur l'animal pour les données collatérales complètes, la corrélation génétique additive et les coefficients d'héritabilité.

Dans ce but, on a recours à la procédure POWELL du programme DXMUX du logiciel DFREML (1983) avec une convergence 10^{-8} .

RESULTATS ET DISCUSSION

Les valeurs moyennes pour le poids du cocon, le poids de la coque, la richesse soyeuse, la fécondité, le taux de fécondation et le taux d'éclosion pour les 5 groupes sont résumées dans le Tableau I. Les larves des groupes de Guilan et de Khorasan Lemon présentent respectivement le poids du cocon le plus élevé et le plus faible (1,722 g et 1,617 g) tandis qu'il n'y a pas de différence considérable entre les groupes Khorasan Orange et Pink. Khorasan Pink et Lemon présentent les valeurs les plus élevées (0,318 g) et les plus faibles (0,236 g) pour le poids de la coque soyeuse comme pour la richesse soyeuse avec respectivement 19,41 % et 14,71 %. Khorasan Orange et Pink présentent le nombre d'oeufs par papillon le plus élevé (511,98) et le plus faible (403,8). Khorasan Orange obtient la moyenne de fertilité des œufs la plus élevée (92,01 %) tandis que Khorasan Lemon présente la valeur la plus faible (81,55) pour ce caractère ainsi que le plus faible pourcentage de taux d'éclosion des œufs (76,22 %). Le groupe de Guilan présente le taux d'éclosion des œufs le plus élevé (87,86 %). L'analyse des valeurs moyennes pour les caractères étudiés montre la faible capacité de production de Khorasan Lemon, qui rendrait une amélioration par le lignage très difficile.

Tous les groupes apparaissent considérablement différents en ce qui concerne le poids de la coque soyeuse et la richesse soyeuse mais ils présentent une tendance similaire pour ces deux caractères. Bien que le poids du cocon soit un caractère très important, la richesse soyeuse détermine la quantité de matière produite. Par conséquent, malgré la même valeur moyenne pour le poids du cocon chez Khorasan Pink et Orange, la richesse soyeuse élève respectivement leurs positions aux rangs les plus élevés.

En ce qui concerne la fécondité des papillons, il n'existe pas de différence importante entre Khorasan Orange, Guilan et Baghdad ; Khorasan Lemon et Pink ne présentent pas non plus de différence pour ce caractère. L'évaluation des résultats pour la fécondité, la fertilité et la capacité d'éclosion montre que les performances de reproduction des larves du groupe Khorasan Lemon sont très faibles tandis que Baghdad et Khorasan Orange se situent dans une classe considérablement plus élevée.

La matrice d'héritabilité et de corrélation génétique des caractères étudiés pour chaque groupe ainsi que pour tous les groupes est présentée dans le Tableau II. Les groupes Guilan (0,4315) et Khorasan Pink (0,3020), les groupes Khorasan Pink (0,4928) et Khorasan Lemon (0,3389) et Khorasan Orange (0,4104) et Khorasan Pink (0,1917) présentent respectivement les valeurs les plus élevées et les plus faibles pour l'héritabilité du poids du cocon, du poids de la coque soyeuse et de la richesse soyeuse. On estime aussi les valeurs d'héritabilité pour les caractères reproductifs, cependant, en raison du faible nombre de valeurs relevées et de l'augmentation de l'écart type, les valeurs obtenues ne présentent pas un très grand degré de fiabilité.

Le poids de la coque soyeuse (0,5081) et la fertilité des œufs (0,0874) présentent l'héritabilité la plus élevée et la plus faible dans tous les groupes. L'héritabilité élevée pour les caractères du poids du cocon, du poids de la coque soyeuse et du taux d'éclosion montre les effets élevés de la variation additive des gènes pour ces caractères, qui permet d'obtenir des performances élevées par la sélection ainsi qu'une amélioration rapide par le lignage comme c'est le cas chez d'autres animaux. Les valeurs d'héritabilité des caractères reproductifs sont faibles, c'est à dire que la fécondité et la fertilité des œufs chez les groupes de vers à soie indigènes sont faibles. Cela est probablement lié à la variation génétique limitée avec la sélection naturelle.

Pour accélérer l'amélioration de ces caractères, on peut donc recommander l'hybridation ou le croisement de retour avec des variétés très productives au lieu des méthodes de consanguinité ou des croisements entre-familles. La corrélation génétique positive élevée entre le poids d'un cocon et le poids de la coque soyeuse (0,8537) indique que la sélection sur la base du poids du cocon améliore beaucoup le poids de la soie du cocon. On observe la corrélation la plus élevée et la plus faible entre ces deux caractères respectivement chez les groupes Khorasan Pink (0,9228) et Khorasan Orange (0,7774).

D'autre part, pour le poids du cocon et la richesse soyeuse, on observe une corrélation négative ou faiblement positive (0,1164 chez tous les groupes). Cette corrélation est négative chez Baghdad, Kh. Lemon et Kh. Orange tandis que Khorasan Pink (0,3835) et Kh. Orange (– 0,4182) présentent la valeur la plus élevée et la plus faible. Par ailleurs, on obtient une corrélation génétique relative élevée entre le poids de la coque soyeuse et la richesse soyeuse (0,5674), et Khorasan Pink et Kh. Orange présentent respectivement les valeurs les plus élevées et les plus faibles pour ces caractères. Les valeurs de corrélation génétique plus élevées entre le poids du cocon, le poids de la coque et la richesse soyeuse que présente le groupe Kh. Pink témoignent de la prédisposition de ce groupe à une amélioration synchronisée des caractères du cocon avec des effets adverses négligeables. Par contre la corrélation plus faible entre les caractères du cocon chez le groupe Kh. Orange montre qu'il serait très difficile de procéder à des améliorations dans le cadre de programmes de lignage. Dans cette étude, les résultats obtenus pour les caractères du cocon d'après l'analyse de corrélation confirment les résultats des recherches de Satenahalli (1990), de Sofi (1999), de Jayaswal et coll., (2000), de Li (1992) de Kumaresan et coll., (2000) et de Rangaiah et coll., (1995).

Les valeurs estimées pour la corrélation génétique entre les caractères de production et de reproduction montrent une corrélation positive entre le poids du cocon / le poids de la coque et la fécondité du papillon (respectivement 0,3518 et 0,2134) ainsi qu'une corrélation négative entre ces deux caractères du cocon et la fertilité (– 0,467 et – 0,4262) et la capacité d'éclosion (– 0,2616 et – 0,1271).

Cela signifie donc que si l'on procède à la sélection sur le poids du cocon et de la coque pendant plusieurs générations successives, cela devrait améliorer la fécondité du papillon femelle et entraver le taux de fertilité et d'éclosion des œufs. Compte tenu de la corrélation génétique positive entre les caractères de reproduction, il faudrait avoir recours à une amélioration synchronisée de ces caractères dans les programmes de lignage.

Selon cette étude, les potentialités génétiques des caractères de production et de reproduction des groupes originaires d'Iran sont considérablement plus faibles que celles des lignées commerciales iraniennes, ce qui gêne l'utilisation économique qu'on peut en faire. Cependant, l'héritabilité élevée des caractères du cocon et de la capacité d'éclosion des groupes indigènes renferme des perspectives encourageantes quant à leur utilisation économique dans le cadre de programmes de lignage complémentaires.

CROP STABILIZATION IN MUGA CULTURE

A. BARAH, D. MECH, U. HAZARIKA AND R. CHAKRAVORTY

Central Muga Eri Research & Training Institute, Central Silk Board, Lahdoigarh-785 700, Assam, India

Antheraea assamensis Helfer is a typical wild silkworm, endemic to North East India. Silk produced by muga silkworm has a glittering golden yellow colour, for which, it occupies an indomitable distinction in the global sericultural map and unconditionally monopolized in the Brahmaputra river valley of Assam in India. At present, muga culture provides gainful occupation to nearly 30,000 families in Assam alone. Since North Eastern Region is a traditional area where muga sericulture is necessarily a part of the culture and the rural economy, efforts to make activities broad-based and integrated can provide further employment to a sizable rural population. But, the efforts made by research and development institutes for the development of muga culture, could not bring any visible change so far in development due to certain inherent constraints of the industry. The constraints confronting development of muga silk industry, as perceived by the farmers, are manifold. However, it was observed that major factor affecting the production is the partial or non-adoption of recommended technology practices by the farmers. Because, in muga culture, in spite of availability of many improved technology practices for host plant as well as for silkworm rearing management, most of the technologies have not been practiced by the farmers and sometimes many of the technologies are not even percolating to the field due to poor extension network. But, production constraints confronted by the muga farmers can easily be taken care of, provided the recommended technology practices, like plantation management, scheduling of crops depending on the season, adoption of prophylactic measures in rearing against pests and diseases, etc., are properly adopted. The study conducted for improving productivity in muga culture through intervention of improved technology packages in integration revealed that productivity of muga cocoons at farmers level can significantly be increased by 66.7% in early spring (March-April) and by 79.3% in late summer (August-September) seed crops. Hence, in order to make muga culture a sustainable economic venture for the farmers, extension network/ machinery has to be strengthened to educate the farmers.

Keywords : Muga culture, constraints, technology intervention, extension.

INTRODUCTION

Due to its varied topography, North East Region (NER) of India offers a complex variety of habitats and ecosystems. As a result, it has become one of the "Mega-Biodiversity" centres of the country endowed with the richest spectrum of flora and fauna, which include varieties of sericigenous insects and plant species. The climatic condition of NER varies from tropical to temperate depending on the topography of the places. The sub-tropical congenial climate and abundance of nature grown muga food plants made the region a natural home of the muga silkworm. Muga silk has a unique distinction among all insect silks due to its golden colour. Muga culture, as a whole, is endemic and isolated into a single geographic pocket of the world, i.e., North East India. Besides having immense export potential due to its natural colour, durability and softness, muga culture has a tremendous scope for economic upliftment of the rural poors through sustainable income and employment generation. But, the study conducted on yield gap analysis in muga culture by Barah *et al.* (2004) through personal

contact method with individual farmer revealed that the major production constraints as perceived by the farmers, are: 1) non-availability of quality seed in time; 2) high cost of seed; 3) uncertainty of crop due to natural vagaries; 4) high incidence of diseases and pests; 5) marketing constraints, *etc.* The efforts made in research and development sector for the overall development of muga culture could not bring perceptible changes in production. Because, in spite of availability of many improved technology practices for host plants as well as for silkworm rearing management, most of the technologies have not been practiced by the farmers due to their strong inclination to traditional practices, unawareness and sometimes for financial constraints. Further, due to poor extension network, many of the technologies are not even percolating to the field. In muga culture, out of 6 overlapping crops conducted throughout the year, only Spring (April-May-June) and Autumn (October-November) are the two seasons for raising commercial crops. Crops conducted during Summer (July-September) and Winter (December-March) are the seed crops, which usually fall in adverse climatic seasons of the year where the ambient temperature is either high or low or the difference between maximum and minimum temperature is very wide. During these seed crops, productivity of cocoons comes down to the level of 10-20%. But these seed crops are unavoidable to maintain the seed chain for production of commercial seeds. Moreover, unlike mulberry sericulture, muga seed is transacted primarily in the form of seed cocoons instead of disease free layings (dfls) at farmers level. Crop loss due to protozoan disease, 'Pebrine' is a perpetual problem in muga sector. The situation is far aggravated due to the practice of supplying seed cocoons to the rearers instead of dfls. Hence, in order to bring stability in muga crops particularly in seed crops, the present study was undertaken in order to assess the existing improved technology components of muga host plant management and silkworm rearing in integration through farmer participatory mode, to ensure productivity, particularly, in seed crops for reaping rich economic dividends.

MATERIALS AND METHOD

A socio-economic survey was conducted covering 50 muga farmers of Golaghat district of Assam to record the benchmark data before technology intervention. Based on the benchmark data, 20 farmers, who were already acquainted with the recommended technology packages, were selected for the study. The study was carried out with eight recommended technologies in integration in order to improve of cocoon productivity at farmers level.

The technologies were:

- 1) Systematic plantation (3m x3m spacing).
- 2) Cultural practices- pruning at 180 cm height during September and top clipping after 1st seed crop rearing in March-April.
- 3) Input application- NPK and cowdung (87 g Urea +125 g Super Phosphate + 33 g Murate of Potash per plant per year in two split doses after pruning in September and after top clipping in April and 10 kg Farmyard Manure per plant per year during February-March).
- 4) Use of microscopically examined dfls.
- 5) Chawki rearing (1st to 3rd instar) on bush plants of manageable height (around 240 cm).
- 6) Use of nylon net during early stage rearing against pests & predators (8m x 8m x 4m size to accommodate 9 plants).
- 7) Prophylactic measures against diseases and pests *i.e.* use of bleaching powder, lime, formalin, *etc.* during rearing.
- 8) Use of improved spinning device.

Test rearing was restricted in two seed crop seasons: early Spring (March-April) and late Summer (August-September) with 200 dfls per farmer per crop. The rearing performance data of each individual farmer after technology intervention was collected through personal contact method for comparison with benchmark data.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The socio-economic survey conducted among 50 muga farmers for recording benchmark information (Tables I & II) revealed that majority of the farmers belonged to above 30 years age group and 90 per cent of them were literate. More than 80 per cent farmers are traditionally associated with muga culture having more than 10 years experience in the culture.

Table I. Bench mark survey data on socio-economic status of the farmers (Sample size : 50 farmers).

Tableau I. Données de base de l'étude sur la situation socio-économique des fermiers (taille de l'échantillon : 50 fermiers).

Particulars	No. of farmers	
<i>Données</i>	<i>Nbre de fermiers</i>	
1. Age	a) 30 – 50 years / 30-50 ans	32
	b) > 50 years / > 50 ans	18
2. Educational status	a) Literate / alphabétisé	44
<i>Niveau d'éducation</i>	b) Illiterate / analphabète	6
3. Source of income	a) Muga & agriculture	36
<i>Source de revenus</i>	b) Muga, agriculture & business	14
4. Occupational status	a) Traditional / Traditionnel	42
in muga culture	b) Newly adopted / Venant d'être adopté	8
<i>Statut professionnel</i>		
<i>dans l'élevage du muga</i>		
5. Experience in muga culture	a) < 10 years / < 10 ans	8
<i>Expérience de l'élevage</i>	b) > 10 years / > 10 ans	42
<i>du muga</i>		

Further, with regard to technology adoption pattern, it is revealed from the gathered information that 50 per cent of the farmers were adopting package of systematic plantation, chawki rearing in bush plants and use of nylon mosquito net against pests and predators in rearing. While around 40 per cent farmers were using agronomical practices, about 20 per cent farmers were acquainted with the use of disease free layings.

Table II. Bench mark survey data on technology adoption pattern of the farmers (Sample size: 50 farmers).*Tableau II. Données de base de l'étude sur le schéma d'adoption de la technologie par les fermiers (taille de l'échantillon : 50 fermiers).*

Technologies	Full	Partial	Nil
	<i>Complètes</i>	<i>Partielles</i>	<i>Nulles</i>
i) Systematic plantation / <i>Plantation systématique</i>	25	10	15
ii) Input application / <i>Apport d'applications</i>	-	36	14
iii) Agronomical practices / <i>Pratiques agronomiques</i>	17	12	21
i) Use of disease free layings / <i>Utilisation de pontes saines</i>	8	25	17
ii) Chawki rearing in bush plants <i>Elevage chawki sur des buissons</i>	25	4	21
iii) Use of nylon net in rearing against pests & predators <i>Utilisation de filets de nylon contre les parasites et les prédateurs</i>	25	2	23
iv) Prophylactic measures against diseases and pests <i>Mesures prophylactiques contre les maladies et les parasites</i>	-	25	25
v) Use of improved spinning device <i>Utilisation de systèmes de filage améliorés</i>	-	2	48

For assessing the impact of technology intervention, sample farmers were grouped into three categories based on benchmark information on range of cocoon production per laying as depicted in the Table III. However, after intervention of recommended technology packages in integration, the picture became quite reverse registering more than 50 per cent of the farmers under highest cocoon producers' range. Data revealed that while average cocoon production at farmers level before technology intervention was 24 cocoons per laying, during early spring (March-April) seed crop, this attained 40 cocoons per laying after technology intervention, recording 66.7 per cent productivity increase.

Similarly, in late Summer (August-September) seed crop, after technology intervention, the average cocoon production at farmers field rose to 52 cocoons per laying as against 29 cocoons per laying during pre-intervention period (Table IV). It registered 79.3 per cent increase in production of muga cocoons.

Table III. Production pattern of sample farmers after intervention of integrated technology packages.**Tableau III. Caractéristiques de la production chez les fermiers échantillons après l'utilisation des systèmes de technologie intégrée.**

Crop	Range of cocoon production (Number/dfl)	No. of farmers	
		Before intervention	After intervention
		<i>Nbre de fermiers</i>	
<i>Récolte</i>	<i>Fourchette de cocons produits (Nbre / ponte saine)</i>	<i>Avant l'intervention</i>	<i>Après l'intervention</i>
Seed crop (Early Spring : March-April)	10-20	10	0
	21-30	6	1
<i>Récolte de grainage</i> (début printemps : mars – avril)	31-40	3	8
	> 40	1	11

Note :

- Average cocoon production (in number):
 - Before intervention = 24 per dfl
 - After intervention = 40 per dfl
1. *Production moyenne de cocons (en nombre)*
 - Avant l'intervention = 24 par ponte saine*
 - Après l'intervention = 40 par ponte saine*
2. Percentage increase in production = 66,7 % / *Augmentation de la production en pourcentage = 66,7 %*

Based on input value and expenditure incurred for technology intervention in plant management and silkworm rearing, cost economics has been calculated. The benefit cost ratio (BCR) after technology intervention has been calculated to be 2.15 against 1.44 of the traditional farmers. The detailed results of the cost economics are shown in Table V.

It has been ascertained that through intervention of recommended technologies in integration, productivity of muga cocoons at farmers level can significantly be increased even during unfavourable seed crop seasons. The findings of the present study is in conformity with the findings of Chole *et al.* (1978), Ahire *et al.* (1999) and Sunildutta and Chole (2002), wherein they found majority of the

respondents belonged to high technology adopter category in mulberry sericulture were the best performers. Dolli (1995) also reported similar findings in post-cocoon technologies in mulberry sericulture. But, the reason for non-awareness of the improved technologies can not only be attributed to poor network of extension, but also to low extension contact and low social participation of the farmers.

Table IV. Production pattern of test farmers after intervention of integrated technology packages.

Tableau IV. Caractéristiques de production chez les fermiers testés après l'utilisation des systèmes de technologie intégrée.

Crop	Range of cocoon production (Number/df)	No. of farmers	
		Before intervention	After intervention
		<i>Nbre de fermiers</i>	
<i>Récolte</i>	<i>Fourchette de cocons produits (Nbre / ponte saine)</i>	<i>Avant l'utilisation</i>	<i>Après l'utilisation</i>
Seed crop (Late Summer : Aug-Sept.)	10-20	3	2
	21-30	10	0
<i>Récolte de grainage</i> (Fin de l'été : Août - Sept)	31-40	7	1
	> 40	0	17

Note :

1. Average cocoon production (in numbers) : i) Before intervention = 29 per df
ii) After intervention = 52 per df

1. *Production moyenne de cocons (en nombre)* i) Avant l'intervention = 29 par ponte saine
ii) Après l'intervention = 52 par ponte saine

2. Percentage increase in production / *Augmentation de la production en pourcentage* = 79.3%

Further, non-adoption of technologies by the farmers, who know about the technologies, may be due to their risk-averting attitude. Because study conducted by Kumareson *et al.* (1999) in mulberry sericulture showed that around 88.3 per cent of the sample farmers were found to be risk averters.

Table V. Economics (Unit : Two seed crops/acre/year).

Tableau V. Aspects économiques (Unité : Deux récoltes de grainage / demi-hectare / année).

Inputs / Dépenses :

Inputs	Without technology support (Rs)	With technology support (Rs)
Dépenses	Sans soutien technologique (Rs.)	Avec soutien technologique (Rs.)
1. Cost of seeds / Coût des graines (800 dfls / 800 pontes saines)	4000.00 (3200 seed cocoons @Rs.1.00 per cocoon + 10 md @ Rs.80.00 per md for processing) (3200 cocons de grainage à 1 Rs par cocon + 10 md à raison de 80 Rs par md pour la transformation)	4800.00 (800 dfls @ Rs.6.00) (800 pontes saines à 6 Rs l'une)
2. Pruning / top clipping of plants (445 plants) 2. Taille / taille des plants au sommet (445 plants)	Not practiced Non pratiqué	320.00 (4 md @ Rs.80.00 / md)
3. Cost of NPK (112 kg) / Coût du NPK (112 kg)	Not practiced / Non pratiqué	672.00 (@ Rs.6.00 / kg)
4. NPK application 4. Application du NPK	Not practiced Non pratiqué	160.00 (2 md @ Rs.80.00 / md)
5. Cost of nylon net (depreciated value for 5 years economic life of 2 nets @ Rs.2400.00 per net) 5. Coût du filet de nylon (amortissement pendant 5 ans de vie économique de 2 filets à raison de 2400 Rs par filet)	Not practiced Non pratiqué	960.00
6. Labourers cost for rearing (800 dfls in two crops) 6. Coût des ouvriers agricoles pour l'élevage (800 pontes saines en deux récoltes)	7360.00 (92 md for scattered plantation @ Rs. 80 / md) (92 md pour une plantation clairsemée à raison de 80.00 Rs. par md)	6400.00 (80 md for systematic plantation @ Rs.80.00 per md) / (80 md pour une plantation systématique à raison de 80 Rs / md)
7. Chemicals for prophylactic use (in lumpsum) 7. Substances chimiques pour une utilisation prophylactique	Not practiced / Non pratiqué	200.00
8. Improved boxtype mountage (depreciated value for 10 years economic life of 4 nos. @ Rs.800.00 each) 8. Encabanage amélioré sous forme de boîte (valeur de l'amortissement pour 4 boîtes sur 10 ans de vie économique à raison de 800 Rs l'une)	Not practiced Non pratiqué	320.00
9. Collection of dry leaves & preparation of 'Jali' mountage 9. Recueil de feuilles sèches et préparation de l'encabanage "Jali"	320.00 (4 md @ Rs.80.00 per md) (4 md à raison de 80 Rs par md)	Not required Non nécessaire
Total Input / Dépenses totales	11,680.00	13,832.00

Table V. (Continued...).

Tableau V. (Suite...).

Outputs:	Traditional	Technology adopters
<i>Recettes :</i>	<i>Traditionnelle</i>	<i>Fermiers ayant adopté la technologie</i>
1. Cocoon production (Average of two seed crops) <i>1. Production de cocons (Moyenne de deux récoltes de grainage)</i>	21,200 (@ 26.5 cocoons/dfl) (à raison de 26,5 cocons / ponte saine)	36,800 (@ 46 cocoons/dfl) (à raison de 46 cocons / ponte saine)
2. Return from cocoons		
a) 60% as seed @ Rs.1.00 per cocoon	12,720	22,080.00
b) 40% as reeling @ Rs.300.00 per 1000)	3,392.00	5,888.00
c) Cut cocoons @ Rs.150.00 per kg (2500 numbers/kg) from 60% cocoons	750.00	1,320.00
2. <i>Rapport des cocons</i>		
a) 60 % comme graines à raison de 1 Rs par cocon	12 720,00	1,320,00
b) 40 % pour le dévidage à raison de 300 Rs pour 1000)	3 392,00	5,888,00
c) Cocons coupés à raison de 150 Rs par kg (2500 cocons / kg) de 60 % des cocons	750,00	1 320,00
3. Return from Firewood (pruning output) <i>3. Rapport du bois de chauffe (production découlant de la taille)</i>	-	500.00
Total Output / Recettes totales	16,862.00	29,788.00
BCR	1.44	2.15

Note: * Rs.= Rupees (Indian currency) / *Roupie (monnaie indienne)*.

** md = man day (eight working hours) / *jour de travail (huit heures de travail)*.

CONCLUSION

It can be inferred from the study that major factor affecting the production in muga culture is the partial or non-adoption of improved technology practices by the farmers. Although the constraints in muga culture as reported by the farmers are many, most of them can easily be overcome through proper adoption of the recommended technology packages. Hence, to ensure muga culture as an assured cash crop during all crop seasons, research and development support along with strong extension machinery is the need of the hour to educate the farmers about the impact of improved technology packages, with particular emphasis towards crop scheduling and seed crop rearing. It will help to evolve on-farm value addition innovations for reaping rich economic dividends from muga culture.

REFERENCES

- AHIRE, R. D., DAKH, A.M. & KULKARNI, R.R. (1999) Correlation of adoption of grape cultivation practices, *Journal of Soils and Crops*, 9(1), 114-117.
- BARAH, A., MECH, D., SINGH, K. C. & SURYANARAYANA, N. (2004) Yield gap : A major prodigium in muga silk industry. *Journal of Assam Science Society*, 45(1), 19-28.
- CHOLE, R.R., SANGLE, G.K. & CHOUKIDAR, L.B. (1978) Use of information sources and adoption of improved wheat varieties. *Research Bulletin, Marathawada Agricultural University*, 2(9), 15-17.
- DOLLI, S., KUMAR, H., IYENGER, M.N.S. & MAJUMDAR, M.K. (1995) Post cocoon technologies. *The Indian Textile Journal*, 105(7), 42-46.
- KUMARESON, P. & VIJAYA PRAKASH, N.B. (1999) Risk on input use in cocoon production. *Indian J. Seric.*, 38(2), 145-148.
- SUNILDUTTA, J. & CHOLE, R.R. (2002) A study on adoption of sericultural practices by sericulturists. *Indian Journal of Sericulture*, 41(1), 1-5

STABILISATION DES RECOLTES DANS L'ELEVAGE DU MUGA

A. BARAH, D. MECH, U. HAZARIKA & R. CHAKRAVORTY

Central Muga Eri Research & Training Institute, Central Silk Board, Lahdoigarh – 785 700, Assam, Inde.

Antherea assamensis Helfer est un papillon sauvage typique endémique du nord est de l'Inde. La soie produite par le ver à soie muga est d'une couleur jaune doré éclatante, c'est pourquoi elle occupe une position distinctive imbattable dans le paysage général de la sériciculture et se concentre de manière inconditionnelle dans la vallée du Brahmaputra dans l'Assam en Inde. A présent, l'élevage du muga offre un emploi rémunérateur à près de 30 000 familles rien que dans l'Assam. Puisque la région du nord est, est une zone traditionnelle où la sériciculture muga fait nécessairement partie de la culture et de l'économie rurales, les efforts pour créer des activités globales et intégrées pourraient créer des emplois supplémentaires pour une population rurale assez importante. Mais, les efforts entrepris par les instituts de recherche et de développement pour le développement de l'élevage du muga, n'ont pas apporté jusqu'à présent de changement visible, en raison de certaines contraintes inhérentes à l'industrie. D'après les fermiers, les contraintes auxquelles le développement de l'industrie de la soie muga doit faire face sont multiples. Cependant, on constate que le principal facteur qui affecte la production est la non-adoption ou l'adoption partielle par les fermiers des technologies pratiques recommandées. Malgré l'existence de nombreuses technologies pour la gestion des plantes hôtes et de l'élevage du ver à soie, la plupart des fermiers n'appliquent pas les technologies et parfois de nombreuses technologies n'arrivent même pas jusqu'au terrain en raison d'un réseau de vulgarisation insuffisant. Mais, on peut facilement faire face aux contraintes de production auxquelles les fermiers muga sont confrontés, à condition que les technologies pratiques recommandées comme la gestion de la plantation, la programmation des récoltes en fonction de la saison, l'adoption de mesures prophylactiques contre les insectes et les maladies au cours de l'élevage, etc.. soient correctement adoptées. L'étude réalisée pour améliorer la productivité de l'élevage du muga par l'intermédiaire de systèmes de technologies intégrées montre qu'on peut considérablement augmenter la productivité des cocons muga au niveau des fermiers de 66,7 % pour les récoltes de grainage du début du printemps (mars – avril) et de 79,3 % pour celles de la fin de l'été (août – septembre). Il faut donc renforcer le réseau / le matériel de vulgarisation pour éduquer les fermiers afin que l'élevage du muga devienne une entreprise économique durable pour les fermiers.

INTRODUCTION

En raison de sa topographie variée, la Région du Nord Est (NER) de l'Inde présente une variété complexe d'habitats et d'écosystèmes. Par conséquent, elle est devenue l'un des centres de " Mega-Biodiversité " du pays doté d'un très riche éventail en matière de flore et de faune, y compris de variétés d'insectes et d'espèces de plantes séricigènes. Les conditions climatiques du NER sont tropicales ou tempérées en fonction de la topographie des lieux. Le climat sub-tropical agréable et l'abondance de plantes hôtes du muga qui poussent à l'état naturel ont fait de la région l'habitat naturel du ver à soie muga. La soie muga se distingue par rapport à toutes les autres soies d'insectes en raison de sa couleur dorée. Dans l'ensemble, l'élevage du muga est endémique et isolé dans une zone

géographique unique au monde, c'est à dire le nord-est de l'Inde. De plus, comme la soie a un potentiel d'exportation immense en raison de sa couleur naturelle, de sa durabilité et de sa douceur, l'élevage du muga renferme un potentiel énorme pour l'amélioration du niveau de vie des pauvres des zones rurales grâce à la génération d'un revenu durable et d'un emploi. Mais, l'étude réalisée par Bara et coll (2004) sur l'écart de rendement dans l'élevage du muga par des contacts directs avec des fermiers montre que les principales contraintes de production d'après les fermiers sont : 1) la non-disponibilité de graines de qualité en temps voulu; 2) le coût élevé des graines ; 3) l'incertitude en matière de récoltes en raison des aléas de la nature ; 4) l'incidence élevée de maladies et d'insectes 5) les contraintes de la commercialisation, etc. Les efforts réalisés dans le secteur de la recherche et du développement pour le développement général de l'élevage du muga n'ont pas apporté de changements perceptibles en matière de production. Malgré l'existence de nombreuses technologies pratiques pour la gestion des plantes hôtes et de l'élevage du ver à soie, la plupart des fermiers n'appliquent pas les technologies soit parce qu'ils leur préfèrent les pratiques traditionnelles, parce qu'ils ne les connaissent pas ou parfois pour des raisons financières. De plus, à cause du mauvais réseau de vulgarisation, de nombreuses technologies n'arrivent même pas jusqu'au terrain. Dans l'élevage du muga, sur 6 récoltes qui se chevauchent pendant l'année, il n'existe que deux saisons d'élevage pour les récoltes commerciales, au printemps (avril – mai – juin) et à l'automne. Les récoltes réalisées en été (juillet – septembre) et en hiver (décembre – mars) sont les récoltes de grainage, qui correspondent en général aux saisons climatiques hostiles où la température ambiante est soit élevée soit faible et où la différence entre la température maximum et minimum est très importante. Pendant ces récoltes de grainage, la productivité des cocons descend au niveau de 10 à 20 %. Mais ces récoltes de grainage sont indispensables pour maintenir la production de graines commerciales. De plus, à la différence de la sériciculture mûrier, les échanges de graines de muga au niveau des fermiers se font principalement sous la forme de cocons au lieu de pontes saines (dfi). Les pertes de récoltes provoquées par la maladie de la " pébrine " sont un problème permanent pour le secteur muga. La situation est encore aggravée par la pratique qui consiste à fournir des cocons aux éleveurs plutôt que des pontes saines. Par conséquent, pour stabiliser les récoltes de muga, en particulier les récoltes de grainage, nous avons réalisé cette étude afin d'évaluer les composantes des technologies actuelles d'amélioration pour la gestion intégrée de la plante hôte et du ver à soie du muga, qui impliquent la participation des fermiers, et permettent d'assurer la productivité, en particulier, des récoltes de grainage et de dégager des profits économiques élevés.

MATERIELS ET METHODES

Nous avons réalisée une étude socio-économique avec 50 fermiers muga dans la zone de Golaghat dans l'Assam pour enregistrer les données de base avant l'utilisation de la technologie. Pour l'étude, on sélectionne 20 fermiers, d'après les données de base, qui connaissent déjà les systèmes de technologies recommandées. L'étude est réalisée autour de huit technologies recommandées de manière intégrée pour améliorer la productivité des cocons au niveau des fermiers.

Les technologies sont :

- 1) Plantation systématique (espacement 3 m × 3 m)
- 2) Pratiques culturales – taille à une hauteur de 180 cm en septembre et taille au sommet après l'élevage de la première récolte de grainage en mars – avril.
- 3) Application des apports - NPK et bouse de vache (87 g d'urée + 125 g de super phosphate + 33 g de murate de potassium par plante par année en deux doses séparées, après la taille en septembre et après la taille sommitale d'avril et 10 kg de fumier de ferme par plante par an en février – mars).
- 4) Utilisation de pontes saines examinées au microscope.
- 5) Elevage chawki (du 1^{er} au 3^{ème} âge) sur des buissons de taille convenable (environ 240 cm)

6) Utilisation de filets de Nylon (8 m × 8 m × 4 m de taille pour abriter 9 plants) contre les insectes et les prédateurs pendant l'élevage du premier âge.

7) Mesures prophylactiques contre les maladies et les insectes, c'est à dire utilisation de chlorure de chaux, de chaux, de formol, etc. au cours de l'élevage.

8) Utilisation d'un système de filage amélioré.

L'élevage expérimental est limité aux deux saisons des récoltes de grainage : début du printemps (mars – avril) et fin de l'été (août – septembre) avec 200 pontes saines par fermier par culture. On recueille les données sur la performance de l'élevage après l'utilisation de la technologie auprès de chaque fermier pour les comparer avec les données de base.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude socio-économique réalisée pour enregistrer les données de base chez 50 fermiers muga (Tableaux I et II) montre que la plupart des fermiers appartiennent à la tranche d'âge des plus de 30 ans et que 90 % d'entre eux sont alphabétisés. Plus de 80 % des fermiers pratiquent l'élevage du muga de manière traditionnelle et ont plus de 10 ans d'expérience de l'élevage.

De plus, en ce qui concerne le mode d'adoption des technologies, d'après les informations réunies, 50 % des fermiers ont recours au système de plantation systématique, à l'élevage chawki dans les buissons et à l'utilisation de filets de Nylon contre les insectes et les prédateurs pendant l'élevage. Tandis qu'environ 40 % des fermiers ont recours aux pratiques agronomiques et qu'environ 20 % des fermiers connaissent l'utilisation de pontes saines.

Pour évaluer l'impact des technologies utilisées, on regroupe les fermiers échantillons en trois catégories d'après les données de base en ce qui concerne la fourchette de production de cocons par ponte, comme le montre le Tableau III. Cependant, après l'utilisation des systèmes de technologies intégrées recommandées, la situation s'inverse puisque plus de 50 % des fermiers se situent dans la catégorie de production la plus élevée. Les données révèlent que tandis que la production moyenne de cocons par les fermiers avant l'utilisation de la technologie est de 24 cocons par ponte au début du printemps (mars – avril), elle atteint 40 cocons par ponte après l'utilisation des technologies, soit une augmentation de la productivité de 66,7 %.

De même, pour la récolte de grainage de la fin de l'été (août – septembre), après l'intervention de la technologie, la production moyenne de cocons par les fermiers s'élève à 52 cocons par ponte contre 29 cocons par ponte au cours de la période avant l'intervention (Tableau IV). On enregistre une augmentation de la production de cocons muga de 79,3 %.

Nous avons calculé le coût économique des technologies pour la gestion des plantes et de l'élevage du ver à soie d'après la valeur des apports et des dépenses encourues. On calcule que le ratio bénéfice-coût (BCR) après l'utilisation de la technologie est de 2,14 contre 1,44 chez les fermiers traditionnels. Les résultats détaillés du coût économique sont présentés dans le Tableau V.

Nous avons démontré qu'on peut considérablement augmenter la productivité des cocons muga au niveau des fermiers même pendant les saisons défavorables des récoltes de grainage en utilisant les technologies intégrées recommandées. Les résultats de cette étude sont conformes à ceux de Chole et coll., (1978), d'Ahire et coll., (1999) et de Sunildutta et Chole (2002), qui ont constaté que la majorité des personnes interrogées qui obtiennent les meilleurs résultats appartiennent à la catégorie de celles qui ont adopté des technologies de pointe pour la sériciculture mûrier. Dolli (1995) a aussi rapporté des observations similaires pour les technologies post-cocon pour la sériciculture mûrier. Mais, on ne peut pas seulement imputer l'ignorance des technologies améliorées au mauvais réseau de vulgarisation, mais aussi aux contacts limités des fermiers en matière de vulgarisation et à leur faible niveau de participation sociale.

De plus, la non-adoption des technologies par les fermiers qui connaissent les technologies, pourrait venir du fait qu'ils hésitent à prendre des risques. L'étude réalisée par Kumareson et coll.,

(1999) pour la sériciculture mûrier montre qu'environ 88,3 % des fermiers échantillons cherchent à éviter les risques.

CONCLUSION

D'après cette étude, on peut conclure que le principal facteur qui affecte la production de vers à soie muga est l'adoption partielle ou la non-adoption des technologies pratiques améliorées par les fermiers. Bien que les fermiers rapportent que les contraintes de l'élevage muga soient nombreuses, la plupart d'entre elles peuvent être facilement surmontées par une adoption correcte de l'ensemble des technologies recommandées. Par conséquent, à l'heure actuelle pour s'assurer de l'élevage du muga comme culture commerciale fiable pendant toutes les saisons, il faut un soutien de recherche et de développement avec un matériel de vulgarisation important pour informer les fermiers sur l'impact des systèmes de technologies améliorés, en accordant une attention particulière à la programmation des cultures et à l'élevage des récoltes de grainage. Cela permettra de mettre au point des innovations à valeur ajoutée dans les fermes pour dégager des profits économiques élevés grâce à l'élevage du muga.

SEASONAL VARIATION AND PERCENTAGE FREQUENCY OF SOIL MYCOFLORA OF *MORUS ALBA* L. FROM DHARWAD

CH. RAMESH & B. P. KABBALAGERI

Mycology and Plant Pathology Laboratory, Karnatak University, Dharwad., Karnataka, India.

Screening of rhizosphere and non-rhizosphere soil mycoflora of Morus alba Linn. was carried out by soil plate method and soil dilution method during the period of 2001-2003. The soil samples were collected at monthly intervals in different seasons from selected mulberry cultivated sites of Dharwad. For isolation of fungi different media were used i. e.; Corn Meal Agar, Potato Dextrose Agar, Yeast Extract Agar, Malt Extract Agar, Dextrose Peptone Agar and Czapek's Dox Agar. Occurrence of soil mycoflora from different soil types during different seasons was recorded to find out fungal diversity and seasonal variation. The species belonging to common genera like Aspergillus, Cladosporium, Rhizopus, Penicillium, Torula and Trichoderma showed their adaptability for all the three seasons and were isolated throughout the year.

Keywords: Mycoflora, rhizosphere, non-rhizosphere, and *Morus alba* L.

INTRODUCTION

Soil is a complex abode of interactive community of microorganisms whose activities largely determine the growth of the plant. The role of fungi in the soil is an extremely complex and is fundamental to the soil ecosystem. Fungi play an important nutrient role in cycling and plant health and development (Newton, 2003). While, some fungi are well known to cause a range of plant diseases and in some cases to devastate agricultural crops, others are known to antagonize plant growth.

Rhizosphere is defined as the zone around root in which microbial growth is stimulated by the release of nutrients. Number of microorganisms in the rhizosphere increase with the age of plants. They are thought to be correlated with quality and quantity of root excretion.

Mulberry (*Morus alba* L.) is one of the major food plants of the silkworm *Bombyx mori* and also being a cash crop it holds a lot of promise in developing countries. Several workers have studied the occurrence of soil mycoflora in mulberry plants but the information is very scanty (Shree & Boraiah, 1987; Tomy *et al.*, 1997; Gangawar & Tangavelu, 1997; Agastian & Vivekanandan, 1998; Rehman *et al.*, 2004). Hence a detailed study has been attempted on the soil mycoflora of mulberry from Dharwad. In the present investigation an emphasis has been made to study the biodiversity and seasonal variation of soil mycoflora from Dharwad.

MATERIALS AND METHODS

Collection of soil samples:

Soil samples were collected from the root system of *Morus alba* L. at the depth of 10-15 cm were collected along with superficial ones from both rhizosphere and non-rhizosphere. The soil samples

were collected from several selected sites of *Morus alba* L. in all seasons i. e.; Winter, Summer and Rainy.

Isolation:

For isolation of soil mycoflora, Soil Plate Method and Soil Dilution Method were used. The Soil Plate Method was carried out according to Warcup (1950).

Soil Dilution Method:

One gram of meshed soil sample was mixed in 250 ml conical flask containing 99 ml of sterilized distilled water so as to get the stock solution. 1 ml of soil suspension was transferred to test tube containing 9 ml of sterilized distilled water. This gives the dilution of 1:1000. This process was repeated to obtain serial dilution of 1:10,000, 1:100,000 and 1:1,000,000. 1 ml from each dilution and media was poured in sterilized petriplates under laminar airflow chamber. Each plate was gently rotated to ensure uniform distribution of suspension. After solidification of the media, plates were incubated in an incubator invertedly and maintained at a temperature of 25°-27°C.

Cultural Media:

The media used for isolation are Corn Meal Agar (CMA), Potato Dextrose Agar (PDA), Yeast Extract Agar (YEA), Malt Extract Agar (MEA), Dextrose Peptone Agar (DPA) and Czapek's Dox Agar (CZA). All the media were prepared as suggested by Booth (1971) in his 'Microbiological methods'.

Presentation of Data:

In presenting the data, the term 'Percentage of frequency' is used throughout the paper. The term "Percentage of frequency" is used to denote the

$$= \frac{\text{Total number of individual fungal occurrence on all the samples in 24 months}}{\text{Total number of fungal occurrence}} \times 100$$

Further the data were analyzed statistically by 4 Factorial RCBD (Randomized Complete Block Design) Method.

RESULTS AND DISCUSSION

Screening study reveals that number of soil mycoflora were associated with rhizosphere and non-rhizosphere of *Morus alba* Linn. investigated for two years during 2001-2003 soil collected from selected sites of *Morus alba* cultivars of Dharwad. A total of eighty-seven species belonging to thirty-seven genera were isolated from the rhizosphere and non-rhizosphere of *Morus alba* L. out of these, nine species of four different genera belongs to Zygomycotina, four species of four different genera belongs to Ascomycotina and the remaining seventy-four species of twenty-nine different genera belongs to Mitosporic fungi.

Qualitative analysis of soil mycoflora from rhizosphere and non-rhizosphere:

Zygomycotina:

Nine species belonging to four genera were identified and their percentage frequency per gram of dry soil is given in Table I. The grand mean percentage frequency of *Mucor hiemalis* showed highest of 0.92 % followed by *Rhizopus arrhizus* (0.76%) and *R. stolonifer* (0.57 %), whereas occurrence of *Absidia glauca* (0.16 %) was less when compared to the rest of the fungi. *Mucor hiemalis* and *Rhizopus arrhizus* showed dominance in rhizosphere and non-rhizosphere soils. However, *Absidia glauca* showed least percentage frequency among rest of the fungi in both the layers.

Martin (1950) found that higher the percentage of readily decomposable carbohydrate material, sugars, starches and some hemicellulosic material, the greater the predominance of *Mucor* and *Rhizopus*. Hence, in the present study the percentage frequency and the number of species of *Mucor* and *Rhizopus* were higher compared to other organisms.

Ascomycotina:

Totally four fungal species assignable to four genera were recorded from rhizosphere and non-rhizosphere. The grand mean percentage of occurrence was high in *Neurospora sitophila* (1.63 %) and *Ascotricha chartarum* (0.85 %), whereas *Emericella ruber* recorded least occurrence of 0.24 %. However, in non-rhizosphere three species belonging to three different genera were isolated. *Chaetomium cochlioides* was absent in this layer. *Neurospora sitophila* showed dominance in both the layers whereas, *Emericella ruber* showed least occurrence compared to rest of the fungi in both the layers (Table II).

Bisby *et al.*, (1933) have recorded that Ascomycotina producing asci in culture, are rarely found in soil isolations, twenty four species were recorded from the soil of Lakenhealth Warren and the Common genera were *Thielavia* and *Gymnoascus*. Waksman (1917) also reported number of species of the genus *Chaetomium* from the different soils. Some of the species isolated in the present study are contrary to the above findings.

Mitosporic Fungi:

Seventy-four fungal species belonging to twenty-nine genera were recorded from rhizosphere and non-rhizosphere. During the estimation of fungal percentage frequency, it was observed that rhizosphere soil possesses highest fungal population as compared to non-rhizosphere (Table III). *Aspergillus niger* was recorded with maximum grand mean of 0.23 % per gram of soil followed by *Aspergillus clavatus* (0.21 %), whereas *Polyschema clavatus* (0.01%) occurrence was less compared to rest of the fungi. In the non-rhizosphere, seventy species belonging to twenty-one genera were recorded. *Aspergillus terricola* var. *americana*, *Monodictys castaneae*, *Phialophora richardsiae* and *Polyschema clavulata* were not recorded in the non-rhizosphere.

The abundance of *Aspergillus* in tropical and subtropical soils was commonly observed in several earlier investigations (Rama Rao, 1970; Domsch and Gams, 1972). The fungal population was more in rhizosphere soil in all the seasons as compared with non-rhizosphere soil, which may be due to the availability of richer nutrient of the plant either by root excretions or sloughed off root cell (Padma & Sudershana, 1975; Sing and Sing, 1982; Das *et al.*, 2004). It is well established from the present result that, fungal populations in rhizosphere and non-rhizosphere soils differ both qualitatively and quantitatively. Perhaps because they prefer a particular type of organic matter present in that region or they lack competitive saprophytic ability to fight against antibiotics/toxic substances produced by other soil mycoflora and/or plants (Mahmood Khalid *et al.*, 2006).

Comparison of rhizosphere and non-rhizosphere soil mycoflora with respect to seasons:

The plant rhizosphere is a dynamic environment in which many factors may affect the structure and species composition of the microbial communities that colonize the roots. It has been shown previously that rhizosphere communities vary spatially in radial direction from the root surface including the endorhizosphere, rhizoplane and rhizosphere zones (Balasubramanian *et al.*, 1970; Garrett 1965; Gochenaur 1975; Campbell *et al.*, 1997; Grayston *et al.*, 1999 and Lemanceau *et al.*, 1995) as well as in specific root locations along the root axis. Microbial communities associated with the rhizosphere also vary depending on the plant species, the soil type and cultural practice, such as crop rotation or tillage. Understanding the structure and species composition of these communities is fundamental for understanding how soil biological processes are influenced by environmental factors.

Table I. Seasonal Occurrence and Percentage Frequency of Zygomycotina in Rhizosphere and Non- rhizosphere Soil of *Morus alba* L. during 2001-2003.

Tableau I. Présence saisonnière et fréquence (%) de Zygomycotina dans la rhizosphère et le sol non-rhizosphère de *Morus alba* L. en 2001-2003.

	Rhizosphere										
	Winter Hiver		Mean Moyenne	Summer Eté		Mean Moyenne	Rainy Saison des pluies		Mean Moyenne	MEAN MOYENNE	
	L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		L ₁	L ₂			
<i>Absidia glauca</i> Hagem	0.82	0.42	0.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.21	
<i>Cunninghamella elegans</i> Lendner	0.00	0.00	0.00	2.38	1.16	1.77	0.00	0.00	0.00	0.59	
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	2.49	1.25	1.87	1.23	0.41	0.82	0.06	0.42	0.24	0.98	
<i>Mucor praini</i> Chodate et Nechitch	1.01	0.48	0.75	0.52	0.25	0.39	0.50	1.06	0.78	0.64	
<i>Mucor racemosus</i> Fresenius	0.52	0.31	0.42	0.32	0.22	0.27	0.45	0.97	0.71	0.47	
<i>Rhizopus arrhizus</i> Fischer	1.16	0.52	0.84	1.34	0.66	1.00	0.51	1.37	0.94	0.93	
<i>Rhizopus cohnii</i> Berlese & de Toni.	0.65	0.26	0.46	0.32	0.19	0.26	0.25	0.56	0.41	0.37	
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenb	0.81	0.35	0.58	0.36	0.17	0.27	0.21	0.77	0.49	0.45	
<i>Rhizopus stolonifer</i> Vuillemin	1.06	0.65	0.86	0.59	0.50	0.55	0.26	0.90	0.58	0.66	
MEAN / MOYENNE	0.94	0.47	0.71	0.78	0.4	0.59	0.25	0.63	0.46	0.59	
Non-Rhizosphere											
	Winter Hiver		Mean Moyenne	Summer Eté		Mean Moyenne	Rainy Saison des pluies		Mean Moyenne	MEAN MOYENNE	Grand Mean Moyenne totale
	L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		L ₁	L ₂			
<i>Absidia glauca</i> Hagem	0.46	0.26	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12	0.16
<i>Cunninghamella elegans</i> Lendner	0.00	0.00	0.00	1.03	0.52	0.77	0.00	0.00	0.00	0.26	0.42
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	1.37	0.69	1.03	1.48	0.76	1.12	0.27	0.64	0.45	0.87	0.92
<i>Mucor praini</i> Chodate et Nechitch	0.77	0.45	0.61	0.39	0.25	0.32	0.28	0.81	0.55	0.49	0.53
<i>Mucor racemosus</i> Fresenius	0.76	0.39	0.78	0.50	0.14	0.32	0.45	0.77	0.61	0.50	0.48
<i>Rhizopus arrhizus</i> Fischer	0.52	0.31	0.42	0.81	0.41	0.61	0.50	1.03	0.77	0.60	0.76
<i>Rhizopus cohnii</i> Berlese & de Toni.	0.57	0.46	0.52	0.39	0.15	0.27	0.29	0.75	0.52	0.44	0.40
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenb	0.66	0.37	0.52	0.43	0.25	0.34	0.15	0.66	0.41	0.42	0.43
<i>Rhizopus stolonifer</i> Vuillemin	0.75	0.30	0.53	0.54	0.25	0.40	0.27	0.72	0.50	0.47	0.57
MEAN / MOYENNE	0.65	0.36	0.53	0.62	0.30	0.46	0.25	0.60	0.42	0.46	0.52

SEM for comparison of Means / Intervalle de confiance de la moyenne pour les comparaisons des moyennes :

Season / Saison - 0.0040, Sphere-0.0033, Layer / Couche - 0.0033, Mycoflora- 0.0100 L₁— Superficial Layer / Couche superficielle, L₂ - 15 cm Depth Layer / Couche à 15 cm de profondeur.

Table II. Seasonal Occurrence and Percentage Frequency of Ascomycotina in Rhizosphere and Non- rhizosphere Soil of *Morus alba* L. during 2001-2003.

Tableau II. Présence saisonnière et fréquence (%) d'Ascomycotina dans la rhizosphère et le sol non-rhizosphère de *Morus alba* L. en 2001-2003.

Mycoflora	Rhizosphere										
	Winter Hiver		Mean Moyenne	Summer Été		Mean Moyenne	Rainy Saison des pluies		Mean Moyenne	MEAN MOYENNE	
	L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		L ₁	L ₂			
Mycoflore											
<i>Ascotricha chartarum</i> Berkeley	1.14	0.47	0.81	1.60	0.90	1.25	0.81	1.91	1.36	1.14	
<i>Chaetomium cochlioides</i> Palliser	1.72	0.72	1.22	0.00	0.00	0.00	0.95	2.25	1.60	0.94	
<i>Emericella ruber</i> Thom & Church	0.00	0.00	0.00	1.08	0.43	0.76	0.00	0.00	0.00	0.25	
<i>Neurospora sitophila</i> Shear & Dodge	4.42	1.91	3.17	0.00	0.00	0.00	1.04	3.08	2.06	1.74	
MEAN / MOYENNE	1.82	0.78	1.30	0.67	0.33	0.50	0.70	1.81	1.26	1.02	
	Non-Rhizosphere										
Mycoflora/ Mycoflore	Winter Hiver		Mean Moyenne	Summer Été		Mean Moyenne	Rainy Saison des pluies		Mean Moyenne	MEAN Grand mean	
	L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		Moyenne MOYENNE globale	
<i>Ascotricha chartarum</i> Berkeley	0.51	0.21	0.36	0.86	0.46	0.66	0.28	1.04	0.66	0.56	0.85
<i>Chaetomium cochlioides</i> Palliser	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.47
<i>Emericella ruber</i> Thom & Church	0.00	0.00	0.00	0.82	0.49	0.66	0.00	0.00	0.00	0.22	0.24
<i>Neurospora sitophila</i> Shear & Dodge	3.90	1.98	2.94	0.00	0.00	0.00	0.68	2.57	1.63	1.52	1.63
MEAN / MOYENNE	1.10	0.55	0.83	0.42	0.24	0.33	0.24	0.90	0.57	0.58	0.80

SEM for comparison of Means / Intervalle de confiance de la moyenne pour la comparaison des moyennes :

Season / Saison - 0.0036, Sphere- 0.0030, Layer / Couche - 0.0030, Mycoflora / Mycoflore - 0.0067

L₁ – Superficial Layer / Couche superficielle, L₂ – 15 cm Depth Layer / Couche à 15 cm de profondeur.

Table III. Seasonal Occurrence and Percentage Frequency of Mitosporic fungi in Rhizosphere and Non- rhizosphere Soil of *Morus alba* L. during 2001-2003.

Tableau III. Présence saisonnière et fréquence (%) des champignons mitosporiques dans la rhizosphère et le sol non rhizosphère de *Morus alba* en 2001-2003.

Mycoflora	RHIZOSPHERE									
	Winter Hiver		Mean Moyenne	Summer Été		Mean Moyenne	Rainy Saison des pluies		Mean Moyenne	MEAN MOYENNE
	L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		
<i>Mycoflore</i>	L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		
HYPHOMYCETES										
<i>Alternaria alternata</i> Keissler	0.26	0.10	0.18	0.12	0.05	0.08	0.09	0.23	0.16	0.14
<i>Alternaria citri</i> Ellis and Pierce	0.15	0.09	0.12	0.00	0.00	0.00	0.08	0.20	0.14	0.09
<i>Alternaria dennistii</i> Ellis	0.24	0.11	0.18	0.00	0.00	0.00	0.10	0.26	0.18	0.12
<i>Alternaria infectoria</i> Fuckel	0.16	0.10	0.13	0.04	0.00	0.02	0.04	0.11	0.08	0.07
<i>Alternaria longipes</i> Mason	0.27	0.13	0.20	0.00	0.00	0.00	0.10	0.23	0.17	0.12
<i>Alternaria pluriseptata</i> Jorstad	0.33	0.16	0.25	0.00	0.00	0.00	0.11	0.27	0.19	0.15
<i>Alternaria tenuissima</i> Wiltshire	0.07	0.02	0.05	0.07	0.06	0.07	0.04	0.07	0.06	0.05
<i>Aspergillus amstelodami</i> Thom & Church	0.14	0.08	0.11	0.07	0.03	0.05	0.05	0.12	0.09	0.08
<i>Aspergillus clavatus</i> Desm.	0.46	0.21	0.34	0.26	0.17	0.22	0.13	0.33	0.23	0.26
<i>Aspergillus flavus</i> Link	0.17	0.08	0.13	0.20	0.09	0.15	0.06	0.13	0.10	0.12
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	0.28	0.19	0.24	0.30	0.15	0.23	0.08	0.22	0.15	0.20
<i>Aspergillus funiculosus</i> Smith	0.21	0.14	0.18	0.11	0.05	0.08	0.07	0.20	0.14	0.13
<i>Aspergillus niger</i> Van Tieghem	0.34	0.13	0.24	0.36	0.18	0.27	0.16	0.42	0.29	0.27
<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	0.03	0.09	0.06	0.00	0.05	0.03	0.06	0.12	0.09	0.06
<i>Aspergillus rugulosus</i> Thom and Raper	0.31	0.11	0.21	0.13	0.04	0.09	0.07	0.17	0.12	0.14
<i>Aspergillus sydowii</i> Thom and Church	0.18	0.08	0.13	0.31	0.15	0.23	0.28	0.14	0.21	0.19
<i>Aspergillus terricola</i> var <i>americana</i> Marchal	0.09	0.05	0.07	0.00	0.03	0.02	0.02	0.08	0.05	0.05
<i>Aspergillus versicolor</i> Tiraboschi	0.19	0.06	0.13	0.00	0.00	0.00	0.04	0.13	0.09	0.07
<i>Cloridium schulzerii</i> Link	0.18	0.06	0.12	0.07	0.04	0.05	0.05	0.16	0.10	0.09
<i>Cladosporium chlorocephalum</i> Mason & Ellis	0.07	0.03	0.05	0.04	0.03	0.04	0.05	0.17	0.11	0.06
<i>Cladosporium elatum</i> Nannf	0.12	0.06	0.09	0.00	0.00	0.00	0.04	0.13	0.09	0.06
<i>Cladosporium herbarum</i> Link	0.18	0.09	0.14	0.00	0.00	0.00	0.06	0.14	0.10	0.08
<i>Cladosporium oxysporum</i> Berk. & Curt.	0.16	0.05	0.11	0.05	0.05	0.05	0.08	0.23	0.16	0.10
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	0.12	0.06	0.09	0.00	0.00	0.00	0.04	0.10	0.07	0.05
<i>Cladosporium tenuissimum</i> Cooke	0.10	0.07	0.09	0.03	0.00	0.02	0.05	0.13	0.09	0.06
<i>Curvularia lunata</i> Boedijn	0.26	0.13	0.20	0.05	0.03	0.04	0.08	0.23	0.16	0.13
<i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i> Ellis	0.18	0.11	0.15	0.00	0.00	0.00	0.06	0.15	0.11	0.08
<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn	0.25	0.12	0.19	0.14	0.07	0.11	0.13	0.29	0.21	0.17

Tableau III. Continued / Tableau III. Suite.

Mycoflora	RHIZOSPHERE									
	Winter Hiver		Mean Moyenne	Summer Eté		Mean Moyenne	Rainy Saison des pluies		Mean Moyenne	MEAN MOYENNE
	L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		
Mycoflore	L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		
<i>Curvularia senegalensis</i> Subram.	0.16	0.10	0.13	0.00	0.00	0.00	0.09	0.15	0.12	0.08
<i>Drechslera australiensis</i> Subramanian & Jain	0.12	0.09	0.11	0.05	0.00	0.03	0.04	0.11	0.08	0.07
<i>Drechslera hawaiiensis</i> Subram. & Jain.	0.12	0.05	0.09	0.00	0.00	0.00	0.09	0.19	0.14	0.08
<i>Fusarium dianthi</i> Prill. & Del.	0.09	0.06	0.08	0.00	0.01	0.01	0.05	0.09	0.07	0.05
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon	0.26	0.12	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06
<i>Fusarium nivale</i> Cesati	0.20	0.09	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05
<i>Fusarium semitectum</i> Berk. & Rav.	0.11	0.07	0.09	0.00	0.03	0.02	0.06	0.17	0.12	0.07
<i>Humicola grisea</i> Traaen	0.00	0.00	0.00	0.20	0.08	0.14	0.00	0.00	0.00	0.05
<i>Memnoniella subsimplex</i> Deighton	0.17	0.06	0.12	0.00	0.00	0.00	0.05	0.13	0.09	0.07
<i>Monilia sitophila</i> Sacc.	0.19	0.08	0.14	0.28	0.13	0.20	0.09	0.21	0.15	0.16
<i>Monodictys castaneae</i> Hughes	0.16	0.07	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.02	0.04
<i>Myrothecium verrucaria</i> Ditmar ex Fr.	0.06	0.04	0.05	0.00	0.00	0.00	0.03	0.08	0.06	0.04
<i>Nigrospora oryzae</i> Petch	0.19	0.12	0.16	0.24	0.15	0.20	0.10	0.30	0.20	0.18
<i>Paecilomyces carneus</i> Duche. et Heim.	0.00	0.00	0.00	0.14	0.07	0.11	0.00	0.00	0.00	0.04
<i>Paecilomyces elegans</i> Corda	0.10	0.07	0.09	0.00	0.01	0.01	0.05	0.13	0.09	0.06
<i>Paecilomyces varioti</i> Bainier	0.14	0.12	0.12	0.00	0.00	0.00	0.08	0.17	0.13	0.08
<i>Penicillium adametzi</i> Zaleski	0.20	0.13	0.17	0.00	0.06	0.03	0.06	0.15	0.11	0.10
<i>Penicillium atramentosum</i> Thom	0.16	0.10	0.13	0.00	0.00	0.00	0.08	0.13	0.11	0.08
<i>Penicillium brefeldianum</i> Dodge	0.14	0.07	0.11	0.10	0.09	0.10	0.06	0.13	0.10	0.10
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	0.08	0.04	0.06	0.13	0.10	0.12	0.05	0.10	0.08	0.08
<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx	0.20	0.08	0.14	0.00	0.00	0.00	0.08	0.17	0.13	0.09
<i>Penicillium diversum</i> Raper and Fennel	0.14	0.09	0.12	0.00	0.00	0.00	0.08	0.12	0.10	0.07
<i>Penicillium islandicum</i> Sopp	0.10	0.08	0.09	0.00	0.04	0.02	0.05	0.11	0.08	0.06
<i>Penicillium lanosum</i> Westling	0.12	0.09	0.11	0.00	0.03	0.02	0.06	0.17	0.12	0.08
<i>Penicillium minio-luteum</i> Dierckx	0.09	0.05	0.07	0.00	0.00	0.00	0.05	0.10	0.08	0.05
<i>Penicillium nigricans</i> Bainier ex Thom	0.18	0.09	0.14	0.00	0.00	0.00	0.11	0.23	0.17	0.10

Tableau III. Continued / Tableau III. Suite.

Mycoflora	RHIZOSPHERE									
	Winter Hiver		Mean Moyenne	Summer Eté		Mean Moyenne	Rainy Saison des pluies		Mean Moyenne	MEAN MOYENNE
	L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		
<i>Mycoflore</i>	L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		
<i>Penicillium oxalicum</i> Thom	0.14	0.10	0.12	0.00	0.00	0.00	0.04	0.09	0.07	0.06
<i>Penicillium variable</i> Sopp	0.08	0.06	0.07	0.03	0.03	0.03	0.02	0.09	0.06	0.05
<i>Phialophora richardsiae</i> Conant	0.10	0.08	0.09	0.00	0.03	0.02	0.01	0.06	0.04	0.05
<i>Polyschema clavulata</i> Ellis	0.06	0.04	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
<i>Rhizoctonia</i> sp.	0.00	0.00	0.00	0.14	0.09	0.12	0.06	0.14	0.10	0.07
<i>Scolecobasidium variable</i> Barron & Busch	0.00	0.00	0.00	0.20	0.10	0.15	0.00	0.00	0.00	0.05
<i>Scopulariopsis communis</i> Bainier	0.07	0.05	0.06	0.00	0.00	0.00	0.05	0.11	0.08	0.05
<i>Spicaria fusispora</i> Saksena	0.06	0.05	0.06	0.01	0.04	0.03	0.03	0.09	0.06	0.05
<i>Stachybotrys alternans</i> Bonorden	0.00	0.07	0.04	0.00	0.00	0.00	0.06	0.16	0.11	0.05
<i>Stachybotrys atra</i> Corda	0.10	0.10	0.10	0.00	0.00	0.00	0.03	0.07	0.05	0.05
<i>Stachybotrys pulchra</i> Speg	0.10	0.05	0.08	0.00	0.00	0.00	0.04	0.10	0.07	0.05
<i>Taeniolella alta</i> Hughes	0.07	0.05	0.06	0.08	0.05	0.07	0.04	0.10	0.07	0.07
<i>Thielaviopsis basicola</i> Ferraris	0.00	0.00	0.00	0.16	0.07	0.12	0.00	0.00	0.00	0.04
<i>Torula herbarum</i> f. <i>quaternella</i> Saccardo	0.26	0.13	0.20	0.18	0.09	0.14	0.13	0.33	0.23	0.19
<i>Trichoderma koningi</i> Oudemans	0.00	0.00	0.00	0.27	0.14	0.20	0.14	0.25	0.20	0.13
<i>Trichoderma lignorum</i> Harz	0.08	0.09	0.09	0.05	0.11	0.08	0.06	0.16	0.11	0.09
<i>Trichoderma viridae</i> Persoon ex Fries	0.27	0.16	0.22	0.11	0.18	0.15	0.13	0.44	0.30	0.22
<i>Veronaea coprophila</i> Ellis	0.09	0.06	0.08	0.00	0.00	0.00	0.03	0.07	0.05	0.04
<i>Volutina concentrica</i> Penzig & Saccardo	0.15	0.10	0.13	0.00	0.00	0.00	0.15	0.27	0.21	0.11
COELOMYCETES										
<i>Pestalotiopsis guepini</i> Steyaert	0.06	0.06	0.06	0.17	0.13	0.15	0.09	0.14	0.12	0.11
MEAN / MOYENNE	0.14	0.08	0.11	0.07	0.04	0.06	0.06	0.15	0.11	0.09

Tableau III. Continued / Tableau III. Suite.

Mycoflora/ Mycoflore	NON-RHIZOSPHERE										Grand mean Moyenne globale
	Winter Hiver		Mean Moyenne	Summer Été		Mean Moyenne	Rainy Saison des pluies		Mean Moyenne	MEAN	
	L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		L ₁	L ₂			
HYPHOMYCETES											
<i>Alternaria alternata</i> Keissler	0.14	0.08	0.11	0.05	0.00	0.02	0.06	0.18	0.12	0.08	0.11
<i>Alternaria citri</i> Ellis and Pierce	0.11	0.06	0.09	0.00	0.00	0.00	0.04	0.11	0.08	0.05	0.07
<i>Alternaria dennisii</i> Ellis	0.12	0.10	0.11	0.00	0.00	0.00	0.06	0.16	0.11	0.07	0.10
<i>Alternaria infectoria</i> Fuckel	0.10	0.05	0.08	0.00	0.00	0.00	0.03	0.08	0.06	0.04	0.06
<i>Alternaria longipes</i> Mason	0.14	0.10	0.12	0.00	0.00	0.00	0.06	0.14	0.10	0.07	0.10
<i>Alternaria pluriseptata</i> Jorstad	0.19	0.09	0.14	0.00	0.00	0.00	0.05	0.12	0.09	0.08	0.11
<i>Alternaria tenuissima</i> Wiltshire	0.05	0.02	0.04	0.00	0.03	0.01	0.02	0.05	0.04	0.03	0.04
<i>Aspergillus amstelodami</i> Thom & Church	0.12	0.10	0.11	0.06	0.02	0.04	0.06	0.11	0.09	0.08	0.08
<i>Aspergillus clavatus</i> Desm.	0.26	0.16	0.21	0.16	0.09	0.13	0.09	0.21	0.15	0.16	0.21
<i>Aspergillus flavus</i> Link	0.11	0.06	0.09	0.12	0.08	0.10	0.04	0.10	0.07	0.09	0.10
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	0.19	0.11	0.15	0.15	0.11	0.13	0.09	0.15	0.12	0.13	0.17
<i>Aspergillus funiculosus</i> Smith	0.18	0.11	0.15	0.00	0.00	0.00	0.06	0.14	0.10	0.08	0.11
<i>Aspergillus niger</i> Van Tieghem	0.22	0.11	0.17	0.26	0.15	0.21	0.11	0.31	0.21	0.19	0.23
<i>Aspergillus parasitics</i> Speare	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03
<i>Aspergillus rugulosus</i> Thom and Raper	0.18	0.10	0.14	0.09	0.00	0.05	0.05	0.10	0.08	0.09	0.11
<i>Aspergillus sydowi</i> Thom and Church	0.14	0.08	0.11	0.16	0.10	0.13	0.10	0.21	0.16	0.13	0.16
<i>Aspergillus terricola</i> var <i>americana</i> Marchal	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
<i>Aspergillus versicolor</i> Tiraboschi	0.11	0.06	0.09	0.00	0.00	0.00	0.04	0.10	0.07	0.05	0.06
<i>Chloridium schulzerii</i> Link	0.10	0.05	0.07	0.00	0.00	0.00	0.04	0.13	0.08	0.05	0.07
<i>Cladosporium chlorocephalum</i> Mason & Ellis	0.05	0.03	0.04	0.00	0.00	0.00	0.04	0.11	0.08	0.04	0.05
<i>Cladosporium elatum</i> Nannf	0.10	0.04	0.07	0.00	0.00	0.00	0.03	0.10	0.07	0.05	0.05
<i>Cladosporium herbarum</i> Link	0.10	0.07	0.09	0.00	0.00	0.00	0.04	0.09	0.07	0.05	0.06
<i>Cladosporium oxysporum</i> Berk. & Curt.	0.13	0.05	0.09	0.00	0.00	0.00	0.06	0.17	0.12	0.07	0.09
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	0.09	0.05	0.07	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.04	0.04	0.05
<i>Cladosporium tenuissimum</i> Cooke	0.08	0.06	0.07	0.00	0.00	0.00	0.03	0.07	0.05	0.04	0.05
<i>Curvularia lunata</i> Boedijn	0.17	0.10	0.14	0.00	0.00	0.00	0.05	0.12	0.09	0.07	0.10
<i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i> Ellis	0.12	0.07	0.10	0.00	0.00	0.00	0.05	0.10	0.08	0.06	0.07
<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn	0.17	0.10	0.14	0.11	0.05	0.08	0.11	0.18	0.15	0.12	0.14
<i>Curvularia senegalensis</i> Subram.	0.13	0.10	0.12	0.00	0.00	0.00	0.05	0.10	0.08	0.06	0.07

Table III. Continued / *Tableau III. Suite.*

NON-RHIZOSPHERE											
Mycoflora/ Mycoflore	Winter Hiver		Mean Moyenne	Summer Été		Mean Moyenne	Rainy Saison des pluies		Mean Moyenne	MEAN	Grand mean
	L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		L ₁	L ₂			
											MOYENNE
<i>Drechslera australiensis</i> Subramanian & Jain	0.10	0.06	0.08	0.00	0.04	0.02	0.03	0.08	0.06	0.05	0.06
<i>Drechslera hawaiiensis</i> Subram. & Jain.	0.09	0.09	0.06	0.00	0.00	0.00	0.06	0.11	0.09	0.05	0.06
<i>Fusarium dianthi</i> Prill. & Del.	0.06	0.05	0.06	0.00	0.00	0.00	0.03	0.07	0.05	0.04	0.04
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon	0.16	0.11	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.05
<i>Fusarium nivale</i> Cesati	0.14	0.08	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.04
<i>Fusarium semitectum</i> Berk. & Rav.	0.09	0.06	0.08	0.00	0.01	0.01	0.03	0.11	0.07	0.05	0.06
<i>Humicola grisea</i> Traaen	0.00	0.00	0.00	0.13	0.06	0.10	0.00	0.00	0.00	0.03	0.04
<i>Memnoniella subsimplex</i> Deighton	0.12	0.06	0.09	0.00	0.00	0.00	0.03	0.08	0.05	0.05	0.06
<i>Monilia sitophila</i> Sacc.	0.16	0.11	0.13	0.25	0.12	0.18	0.04	0.12	0.08	0.13	0.15
<i>Monodictys castaneae</i> Hughes	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
<i>Myrothecium verrucaria</i> Ditmar ex Fr.	0.05	0.03	0.04	0.00	0.00	0.00	0.03	0.06	0.05	0.03	0.03
<i>Nigrospora oryzae</i> Petch	0.14	0.09	0.12	0.12	0.09	0.11	0.05	0.16	0.12	0.11	0.15
<i>Paecilomyces carneus</i> Duche. et Heim.	0.00	0.00	0.00	0.11	0.06	0.9	0.00	0.00	0.00	0.03	0.03
<i>Paecilomyces elegans</i> Corda	0.09	0.06	0.08	0.00	0.00	0.00	0.04	0.10	0.07	0.05	0.05
<i>Paecilomyces varioti</i> Bainier	0.11	0.07	0.09	0.00	0.00	0.00	0.04	0.08	0.06	0.05	0.07
<i>Penicillium adametzi</i> Zaleski	0.13	0.11	0.12	0.00	0.03	0.02	0.05	0.10	0.08	0.07	0.09
<i>Penicillium atramentosum</i> Thom	0.12	0.08	0.10	0.00	0.00	0.00	0.04	0.08	0.06	0.05	0.07
<i>Penicillium brefeldianum</i> Dodge	0.08	0.06	0.07	0.09	0.06	0.08	0.05	0.09	0.07	0.07	0.09
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	0.05	0.03	0.04	0.12	0.08	0.10	0.05	0.07	0.06	0.07	0.08
<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx	0.11	0.06	0.09	0.00	0.00	0.00	0.05	0.12	0.09	0.06	0.07
<i>Penicillium diversum</i> Raper and Fennel	0.11	0.07	0.09	0.00	0.00	0.00	0.06	0.10	0.08	0.06	0.06
<i>Penicillium islandicum</i> Sopp	0.07	0.06	0.07	0.00	0.00	0.00	0.04	0.06	0.05	0.04	0.05
<i>Penicillium lanosum</i> Westling	0.10	0.07	0.09	0.00	0.00	0.00	0.04	0.11	0.08	0.05	0.07
<i>Penicillium minio-luteum</i> Dierckx	0.08	0.04	0.06	0.00	0.00	0.00	0.03	0.08	0.06	0.04	0.04
<i>Penicillium nigricans</i> Bainier ex Thom	0.13	0.07	0.10	0.00	0.00	0.00	0.07	0.14	0.11	0.07	0.09
<i>Penicillium oxalicum</i> Thom	0.11	0.08	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.03	0.04	0.05
<i>Penicillium variable</i> Sopp	0.07	0.04	0.06	0.00	0.03	0.02	0.00	0.05	0.03	0.03	0.04
<i>Phialophora richardsiae</i> Conant	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02

Table III. Continued / Tableau III. Suite.

NON-RHIZOSPHERE											
Mycoflora/ Mycoflore	Winter Hiver		Mean Moyenne	Summer Eté		Mean Moyenne	Rainy Saison des pluies		Mean Moyenne	MEAN	Grand mean
	L ₁	L ₂		L ₁	L ₂		L ₁	L ₂			
											MOYENNE
<i>Polyschema clavulata</i> Ellis	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
<i>Rhizoctonia</i> sp.	0.00	0.05	0.03	0.11	0.07	0.09	0.05	0.11	0.08	0.06	0.07
<i>Sclerobasidium variabile</i> Barron & Busch	0.00	0.00	0.00	0.12	0.08	0.10	0.00	0.00	0.00	0.03	0.04
<i>Scopulariopsis communis</i> Bainier	0.06	0.05	0.05	0.00	0.00	0.00	0.03	0.08	0.05	0.04	0.04
<i>Spicaria fusispora</i> Saksena	0.05	0.04	0.05	0.00	0.03	0.02	0.00	0.06	0.03	0.03	0.04
<i>Stachybotrys alternans</i> Bonorden	0.00	0.05	0.03	0.00	0.00	0.00	0.04	0.12	0.08	0.04	0.04
<i>Stachybotrys atra</i> Corda	0.08	0.07	0.08	0.00	0.00	0.00	0.03	0.07	0.05	0.04	0.05
<i>Stachybotrys pulchra</i> Speg	0.08	0.04	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.04	0.04	0.04
<i>Taeniolella alta</i> Hughes	0.06	0.03	0.05	0.07	0.05	0.06	0.03	0.09	0.06	0.06	0.06
<i>Thielaviopsis basicola</i> Ferraris	0.00	0.00	0.00	0.13	0.07	0.10	0.00	0.00	0.00	0.03	0.04
<i>Torula herbarum</i> f. <i>quaternella</i> Saccardo	0.18	0.11	0.15	0.12	0.06	0.09	0.09	0.20	0.15	0.13	0.16
<i>Trichoderma koningi</i> Oudemans	0.00	0.00	0.00	0.21	0.12	0.17	0.06	0.18	0.12	0.10	0.11
<i>Trichoderma lignorum</i> Harz	0.07	0.08	0.08	0.00	0.10	0.05	0.04	0.11	0.08	0.07	0.08
<i>Trichoderma viridae</i> Persoon ex Fries	0.16	0.11	0.14	0.09	0.15	0.12	0.08	0.18	0.13	0.13	0.17
<i>Veronaea coprophila</i> Ellis	0.05	0.04	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.03	0.03	0.03
<i>Volutina concentrica</i> Penzig & Saccardo	0.11	0.07	0.09	0.00	0.00	0.00	0.07	0.13	0.10	0.06	0.09
COELOMYCETES											
<i>Pestalotiopsis guepini</i> Steyaert	0.04	0.05	0.05	0.15	0.11	0.13	0.06	0.11	0.09	0.09	0.10
MEAN / MOYENNE	0.09	0.06	0.09	0.04	0.03	0.03	0.04	0.10	0.07	0.06	0.08

SEM for comparison of Means / Intervalle de confiance de la moyenne pour la comparaison des moyennes :

Season / Saison - 0.0002, Sphere - 0.0002, Layer / Couche - 0.0002, Mycoflora / Mycoflore - 0.0012

L₁ - Superficial Layer / Couche superficielle, L₂ - 15 cm Depth Layer / Couche à 15cm de profondeur.

Absidia glauca was exclusively found in winter season both in rhizosphere and non-rhizosphere region whereas the species of *Mucor* and *Rhizopus* occur in all the seasons and hence were found adaptable to various temperature fluctuations. *Neurospora sitophila* was observed throughout the year exhibiting highest percentage frequency in winter and rainy seasons. *Chaetomium cochlioides* was observed in summer season whereas; *Ascotricha chartarum* was recorded only in winter season (Table II, Fig. 1). Here density of some of the fungal population showed fluctuations according to the seasonal changes and also according to the easily acceptable nutrients.

Species of *Aspergillus terricola* var. *americana*, *A. versicolor*, *Cladosporium elatum*, *C. herbarum*, *C. sphaerospermum*, *M. subsimplex*, *Paecilomyces varioti*, and *Veronea coprophila* were recorded in winter and rainy seasons. *Humicola grisea*, *Paecilomyces carneus* and *Scolecobasidium variable* are exclusively found in summer season. Fungal species like *Alternaria alternata*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus rugulosus*, *Aspergillus sydowi*, *Cladosporium oxysporum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia pallescens*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium variable*, *Spicaria fusispora*, *Taeoniellella alta*, *Torula herbarum* f. *quaternella*, *Trichoderma lignorum*, and *Pestalotiopsis guepini* were observed to be adaptable to the various temperature fluctuations and hence, are found in all the seasons (Table No. III, Fig. 1). The isolation of these fungi from both regions and especially those with highest occurrence frequency shows that these are physiologically and genetically more versatile, not only in coping with the harshness of the climate but also they have an extensive enzyme system to degrade organic matter of various nature and have strong resistance to soil pollutants like heavy metals, herbicides, pesticides and antibiotics produced by other fungi and/or plants (Mahmood Khalid *et al.*, 2006; Shalaby *et al.*, 2002; Baig *et al.*, 2003; Lebedeva *et al.*, 1999).

Fungal occurrence in the mulberry field soil showed a definite seasonal incidence (Table I, II & III). During the summer season when soil moisture was very low, fungal counts were also low, because spores must be in resting form hence resulting in low biovolume of fungi during the hot season. In the present study fungal population were also reduced in summer and desiccation could be responsible for such a reduction. Usha *et al.*, (2002) and Das *et al.*, (2004) have also reported similar results. However, highest population of mycoflora was recorded in superficial layer in winter season (Table I, Fig. 1), while in rainy season fungal population was predominantly found at the 15 cm depth layer, because of washing off the fungal spores in superficial layer. This supports the findings of Shree and Boraiah (1987); Basumatary *et al.*, (2004) and Rahman *et al.*, (2004) who have observed similar results.

Effectiveness of different media in the isolation of soil mycoflora:

The use of a single medium is again a limiting factor to several fungi. So, in addition to Czapek's sucrose nitrate agar and Dextrose peptone agar, a weak medium such as Yeast extract agar has also been used during the course of study. On this weak medium, the growth of the fast growing fungi was suppressed and the slow growing fungi get a chance to appear on plates. Besides these media, media like Potato dextrose agar, Malt extract agar and Cellulose yeast extract agar were also used.

The use of different media i. e.; PDA, CZA, MEA, YEA, DPA and CMA resulted in the isolation of different species (Fig 2).

In Zygomycotina, 9 species representing 4 genera were isolated by using different media. The number of species isolated in particular media are, 4 species in PDA, 4 species in CZA, 2 species in MEA, 1 species in YEA and in 1 species in DPA were isolated, whereas in CMA media none of the species were reported (Fig. 2).

Among Ascomycotina, 4 species have been isolated by using all the media. By using PDA 1 species, 1 species by CZA, 4 species by MEA, 1 species by YEA and 2 species by CMA were isolated. Not even a single species of Ascomycotina was grown on DPA (Fig. 2).

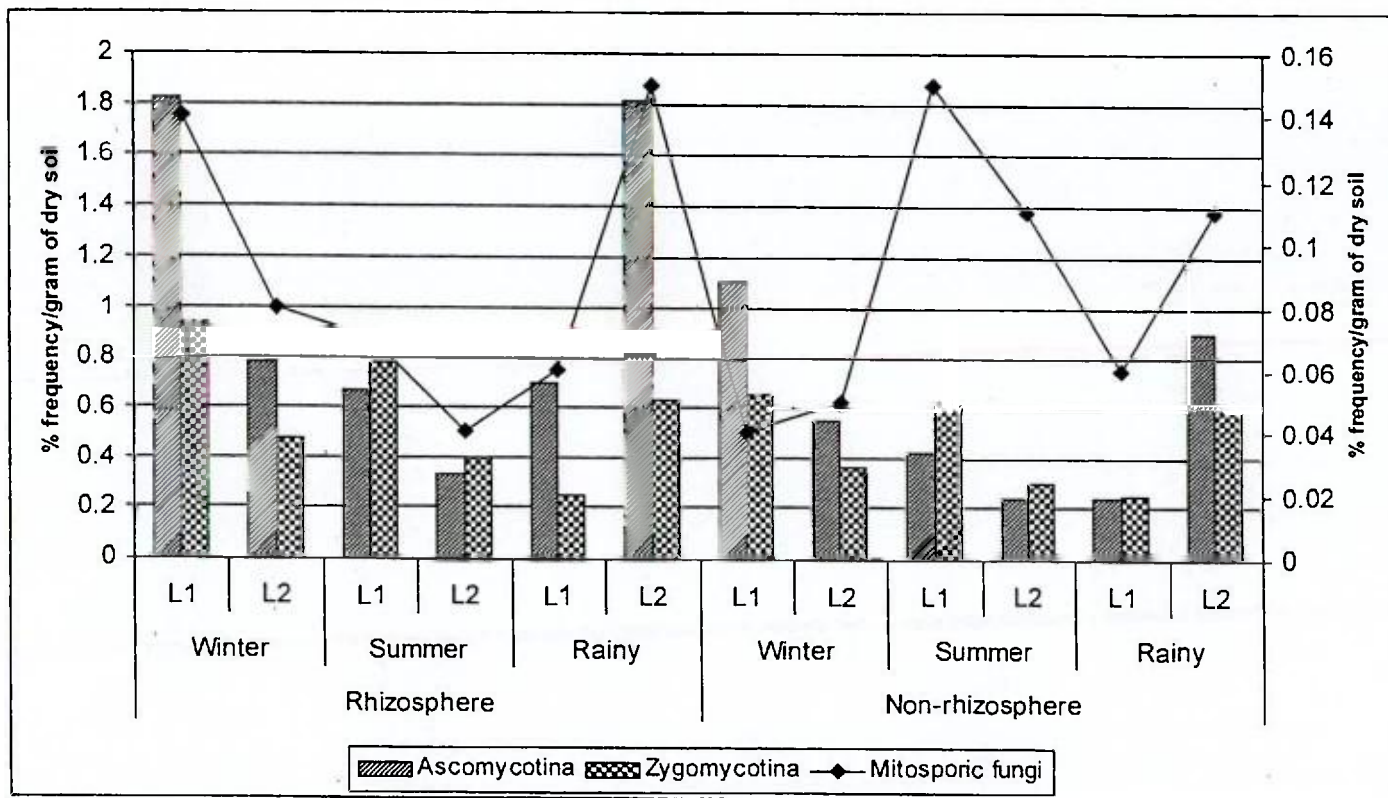


Figure 1. Comparison of rhizosphere and non-rhizosphere fungal groups with respect to season.

Figure 1. Comparaison des groupes fongiques de la rhizosphère et de la non-rhizosphère en fonction de la saison.

% frequency / gram of dry soil / Pourcentage / gramme de sol sec. Winter / Hiver. Summer / Été. Rainy / Saison des pluies.

L1- Superficial layer / Couche superficielle. L2 - 15cm Depth layer / Couche à 15 cm de profondeur.

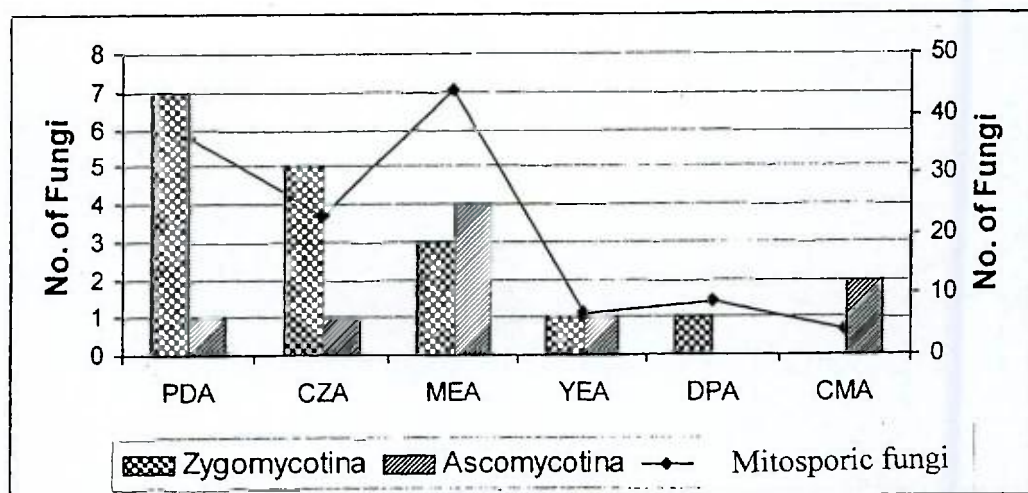


Figure 2. Comparison in the occurrence of soil mycoflora isolated by using different media.

Figure 2. Comparaison de la présence de mycoflore dans le sol isolée en utilisant différents milieux.

No. of fungi / Nbre de champignons.

Totally 74 species representing 29 genera were isolated from Mitosporic fungi by using all the media. Out of these 36 species on PDA media, 23 species on CZA, 44 species on MEA, 7 species on YEA, 9 species on DPA and 3 species on CMA were isolated (Fig. 2).

Maximum number of species was isolated on Malt extract agar media. Totally 87 species were isolated by using these media, which is quite a large number from these environments. It was possible because of the use of different media. This might be due to compatibility of the medium or dilution factors.

The difference in the results obtained by the different media and also methods used can be attributed mainly to the difference in the dilutions used or other factors such as possible failure of some fungi to enter in to soil suspensions are also important and it is not known (Warcup, 1957).

It is reported that soil dilutions and plating procedures obtained many genera of fungi from the rhizosphere of native health land plants and it is found that a higher percentage of these were capable of maximal growth in a simple glucose-salts medium and in amino acids supplemented media than fungi from root free soil (Elroy & Bryan, 1986).

Azaz & Hasenekoglu (1997) isolated microfungi from soil samples prior to irrigation. The richest genera in terms of the number species were *Aspergillus* (25 species), *Penicillium* (22 species), *Acremonium* (7 species) and *Fusarium* (6 species) although *Aspergillus* has the largest no. of species, *Penicillium* has the most abundant colony formation in taxa quantitatively it was determined that there was an increase in microfungus propagules in 1gm of oven dried soil equivalent to fresh soil microfungi irrigation.

Hasenekoglu (1985) performed quantitative analysis of the microfungi flora of forest grass and field soil in the vicinity of Sarikamis. He reported that the genus *Penicillium* most common in terms of species and intensity in his research.

Asan (1994) studied the flora of *Penicillium* and *Aspergillus* in different habitat soils in Edirne. He found 23 species and two varieties belonging to *Aspergillus* and 16 species belonging to *Penicillium*.

Sulun & Hasenekoglu (1993) researched the flora of *penicillium* and *Aspergillus* in North-East Anatolia. In their research they found 20 species of *Aspergillus* and 22 of *Penicillium*.

The results of these studies performed in different regions of Turkey are in accordance with those of our work. Which proves that the genus *Penicillium* is a most common one in the soil.

Ismail & Abdullah (1977) conducted a research on the soil of Iraq where climatic and edaptic factors are very similar to those of our research field.

REFERENCES

- AGASTIAN, S.T.P. & VIVEKANANDAN M. (1998). Rhizosphere microflora of mulberry genotypes grown in the Coastal saline soil. *Sericologia*, 38(1): 131-135.
- ASAN (1994). The determination of *Penicillium* and *Aspergillus* species in Edirne soil and their season distribution. *Turk. J. Biol.*, 18: 291-303.
- AZAZ, A.D. & HASENEKOGLU (1997). An investigation into the microfungi fore of field soil in the GAP (Southeastern Anetole Project) irrigation area of Harran Plain. *Turk. J. Bot.*, 21: 165-172.
- AZAZ, A.D. & HASENEKOGLU (1998). Harren Ovasinda GAP Kinci redamade suennes p.an anan fara ve isenmomis toprekann mikrofungus forest uzorine bir arastirre Kokem Derq. 21: 165.
- BAIG MM, MANE VP, MORE DR, SHINDE LP, BAIG MI. (2003). Utilization of banana agricultural waste: production of cellulases by soil fungi. *J Environ Biol.* 24(2):173-176.
- BALASUBRAMANIAN A, BAGYARAJ DJ, RANGASWAMI G. (1970). Studies of the influence of foliar application of chemicals on the micro flora and certain enzyme activities in the rhizosphere of Eleusine coracane Gaertn. *Plant and Soil.* 32(1-3): 198-206.
- BASUMATARY, S.K., AHMED M. & RAHMAN A. (2004). Rhizosphere and non-rhizosphere microfungi of Tulsi *Ocimum sanctum* (Lamiaceae)- A Medicinal Plant. *Environment and Ecology.* 22(Spl-4): 615-617.
- BISBY, G.R., JAMES N. & TIMONIN, M.I. (1933). Fungi isolated form Manitoba soil by the plate method. *Can. J. Res. Sect., C-8:* 253-275.
- BOOTH, C. (1971) *Methods in Microbiology* Vol. 4, Academic Press, New York, pp. 795.
- CAMPBELL, C.D., S.J. GRAYSTON & D.J. HIRST. (1997). Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *J. Microbiol. Methods* 30:33-41.
- DAS, K., RANJANA DAS, BARUA, P. & BORA, K. N. (2004). Seasonal distribution of soil mycoflora in Som plantation (*Persea bombycine* Kost) of Jorhat, Assam. *Indian J. Seric.*, 43(1): 103-105.
- DOMSCH K.H. & GAMS, W. (1972) *Fungi in agricultural soils.* Longman Publication, London, pp. 290.
- ELROY A. CURL & BRYAN TRUELOVE. (1986). 'The Rhizosphere' Springer Verlay. Berlin Heidelberg. New York. Tokyo.
- GANGAWAR, S. K. & THANGAVELU K. (1997). Population dynamics of *Azotobacter* and other microbial groups in Mulberry plantation. *Sericologia.* 37(4): 717-721.
- GARRETT SD. (1963). *Soil Fungi and Soil Fertility.* Oxford: Pergamon Press; pp. 1-165.
- GOCHENAUR SE. (1975). Distributional patterns of mesophilous and thermophilous microfungi in two Bahamian soils. *Mycopathologia.* 57(3):155-164
- GRAYSTON, S. J., S. WANG, C. D. CAMPBELL, & A. C. EDWARDS. (1998). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 30:369-378.

- HASENEKOGLU (1995). Sankams cvanndak orman oayr ve tara toprakornn mikrofungus oneliz. Kokem Derg. 8: 40-46.
- ISMAIL ALS & ABDULLAH SH SK (1977). Studies on the soil fungi off Iraq Proc Indian Acad Sci., 8: 151-158.
- LEBEDEVA E, NAZARENKO AV, VEDENYAPINA EG. (1999). Soil micromycetes in the area of "Severstal" Metallurgical Works (Cherepovets, Russia). Botanica Lithuanica. Suppl. 3:107-110.
- LEMANCEAU, P., T. CORBERAND, L. GARDAN, X. LATOUR, G. LAGUERRE, J. M. BOEUFGRAS, & C. ALABOUVETTE. (1995). Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol. 61:1004-1012
- MAHMOOD KHALID, WEI-JUN YANG, NAZIR KISHWAR, ZAHID IQBAL RAJPUT & ABDULLAH G. ARIJO (2006). Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium. J Zhejiang Univ Sci B. 7(6): 459-466.
- MARTIN, J.P. (1950). Use of acid, rose Bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. Soil Sci., 69: 215-232.
- NEWTON C., MARCIAL GOMES, OLAJIRE FAGBOLA, RODRIGO COSTA, NORMA GOUVEA RUMJANCK, ARNO BUCHNER, LEDA MENDONA HAGLER & KORNELIA SMALLA. (2003). Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. Appl. Environ. Microbiol., 69(7): 3758-3766.
- PADMA BAI LUKE AND SUDARSHANA DEVI, S. (1975). Rhizosphere mycoflora of *Pisum sativum* L. New Bot., II: 128-131.
- RAHMAN A. BASUMATARY, S.K. & AHMED M. (2004). Rhizosphere and non-rhizosphere mycoflora of Mulberry (*Morus sp.*) growing in Goalpara district, Assam, India. Environment and Ecology. 22(2): 459-460.
- RAMA RAO P. (1970). Studies on soil fungi III. Seasonal variation and distribution of microfungi in some soils of Andhra Pradesh (India). Mycopathol. Mycol. Appl., 40: 277-298.
- SHALABY AM, RIZK MA, MOUSSA TAA. (2002). Effect of igran on the rhizosphere mycoflora of vicia faba plants grown in soils infested with orabanche crenata and amended with rhizobium leguminosarum. Pakistan Journal of Biological Sciences. 5(5):517-520.
- SHREE, M.P. & BORAIHAH, G. (1987). Studies on the rhizosphere and rhizoplane mycoflora of *Morus indica* L. Sericologia., 27(4): 661-670.
- SING, N. & SING, R.S. (1982). Effect of Oil cake amended soil atmosphere on pigeonpea wilt pathogen. Indian Phytopathol., 35: 300.
- SULUN Y. & HASENEKOGLU (1993). A study on Aspergillus Mich ex Fr. And Penicillium Link ex Cray flora of the Northeast Anatola. Turk J. Biol., 17: 49-60.
- TOMY PHILIP, D.D., SHARMA & GOVINDAIAH, (1997). Fungal and Bacterial association with root rot of Mulberry. Indian J. Seric., 36(1): 27-29.
- USHA PUROHIT, SANTOSH K. MEHAR & S SUNDARAMOORTHY. (2002) Role of *Prosopis cineraria* on the ecology of soil fungi in Indian Desert. Journal of Arid Environment, 52: 17-27.
- WAKSMAN, S.A. (1917). Is there any fungus flora of the soil? Soil Sci., 3: 565-589.
- WARCUP, J.H. (1950). The soil plate method for isolation of fungi from soil. Nature, 100: 117-118.
- WARCUP, J.H. (1957). Studies on the occurrence and activity of fungi in a Wheat field soil. Trans. Br. Mycol. Soc., 40(2): 237-262.

VARIATION SAISONNIERE ET FREQUENCE DE LA MYCOFLORE DU SOL DE *MORUS ALBA* L. A DHARWAD

CH. RAMESH & B. P. KABBALAGERI

Mycology and Plant Pathology Laboratory, Karnatak University, Dharwad, Karnataka, Inde.

*On a analysé la mycoflore du sol dans la rhizosphère et hors de la rhizosphère de **Morus alba** Linn., par la méthode de la plaque et par la méthode de dilution du sol pendant la période allant de 2001 à 2003. On recueille des échantillons de sol tous les mois pendant les différentes saisons dans des sites choisis de culture du mûrier à Dharwad. Pour l'isolement des champignons, on utilise différents milieux c'est à dire de l'agar de farine de maïs, de l'agar de dextrose de pomme de terre, de l'agar d'extrait de levure, de l'agar d'extrait de malt, de l'agar de peptone de dextrose et de l'agar de Czapek Dox. On a répertorié la mycoflore présente dans différents types de sol pendant les différentes saisons pour déterminer la diversité fongique du sol et la variation saisonnière. Les espèces appartenant aux genres courants comme **Aspergillus**, **Cladosporium**, **Rhizopus**, **Penicillium**, **Torula** et **Trichoderma** montrent leur adaptabilité pendant les trois saisons et sont isolées tout au long de l'année.*

INTRODUCTION

Le sol est la demeure complexe d'une communauté interactive de micro-organismes dont les activités déterminent dans une large mesure la croissance de la plante. Le rôle des champignons dans les sols est fondamental pour l'écosystème du sol. Les champignons jouent un rôle nutritif dans le cycle, la santé et le développement des plantes (Newton, 2003). Alors que certains champignons sont très connus pour causer des maladies variées chez les plantes et, dans certains cas, dévaster les cultures agricoles, on sait que d'autres entravent la croissance de la plante.

On définit la rhizosphère comme la zone autour de la racine où la croissance microbienne est stimulée par la libération de nutriments. Le nombre de micro-organismes dans la rhizosphère augmente avec l'âge des plantes. On pense qu'ils sont corrélés avec la qualité et la quantité de racines produites.

Le mûrier (*Morus alba* L.) est la plante hôte du ver à soie *Bombyx mori* et comme c'est une culture commerciale, il renferme beaucoup de promesses pour les pays en voie de développement. Plusieurs chercheurs ont étudié la mycoflore présente dans le sol chez les plants de mûrier mais les informations sont très rares (Shree et Boraiah, 1987 ; Tomy et coll., 1997 ; Gangawar et Tangavelu, 1997 ; Agastian et Vivekanandan, 1998 ; Rehman et coll., 2004). Par conséquent, nous avons essayé de réaliser une étude détaillée sur la mycoflore du sol chez le mûrier à Dharwad. Dans cette étude, nous avons mis l'accent sur l'étude de la biodiversité et de la variation saisonnière de la mycoflore du sol à Dharwad.

MATERIELS ET METHODES

Recueil des échantillons de sol :

On recueille les échantillons de sol entourant le système racinaire de *Morus alba* L. à la profondeur de 10 – 15 cm et en superficie à la fois dans la rhizosphère et la non-rhizosphère. On

recueille les échantillons de sol sur plusieurs sites de culture de *Morus alba* L. pendant toutes les saisons c'est à dire en hiver, en été et pendant la saison des pluies.

Isolement :

Pour l'isolement de la mycoflore du sol, on utilise la méthode des plaques d'ensemencement et la méthode de dilution du sol. On procède à la méthode des plaques d'ensemencement du sol selon Warcup (1950).

Méthode de dilution du sol :

On mélange un gramme d'échantillon de sol tamisé dans une flasque conique de 250 ml contenant 99 ml d'eau distillée stérilisée de manière à obtenir la solution mère. On transfère un ml de suspension du sol dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile. Cela donne la dilution de 1 : 1000. On répète ce processus pour obtenir une dilution en série de 1 : 10 000 ; 1 : 100 000 et 1 : 1 000 000. On verse 1 ml de chaque dilution dans des boîtes de Petri sous une hotte à flux laminaire. On fait doucement tourner chaque plaque pour assurer une distribution uniforme de la suspension. Après la solidification des milieux, on incube les plaques dans un incubateur inversé et on les maintient à la température de 25° - 27° C.

Milieux de culture :

Les milieux utilisés pour l'isolement sont l'agar de farine de maïs (CMA), l'agar de dextrose de pomme de terre (PDA), l'agar d'extrait de levure (YEA), l'agar d'extrait de malt (MEA), l'agar de peptone de dextrose (DPA) et l'agar de Dox Czapek (CZA). On prépare tous les milieux d'après les suggestions de Booth (1971) dans ses " Méthodes microbiologiques ".

Présentation des données :

Pour présenter les données, on utilise le terme " Pourcentage de fréquence " dans tout l'article. Le terme " Pourcentage de fréquence " est utilisé pour indiquer le :

$$= \frac{\text{Nombre total de chaque champignon présent dans tous les échantillons pendant 24 mois}}{\text{Nombre total de champignons présents}} \times 100$$

De plus, on analyse les données de manière statistique par RCBD (Conception en Blocs Complètement Aléatoires) à 4 facteurs.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude analytique révèle que la quantité de mycoflore dans le sol est associée à la rhizosphère et à la non-rhizosphère de *Morus alba* Linn. étudiée pendant deux ans de 2001 à 2003 à partir de sol recueilli dans des sites choisis pour les cultivars de *Morus alba* de Dharwad. On a isolé un ensemble de 87 espèces appartenant à 37 genres dans la rhizosphère et la non-rhizosphère de *Morus alba*, parmi elles, neuf espèces de quatre genres différents appartiennent aux Zygomycotina, quatre espèces de quatre genres différents appartiennent à Ascomycotina et les soixante quatorze espèces restantes de vingt neuf genres différents appartiennent aux champignons mitosporiques.

Analyse qualitative de la mycoflore dans le sol de la rhizosphère et de la non-rhizosphère : Zygomycotina :

On identifie neuf espèces appartenant à quatre genres et leur pourcentage de fréquence par gramme de sol sec est présenté dans le Tableau I. Le pourcentage de fréquence moyenne totale est le plus élevé pour *Mucor hiemalis* (0,92 %), suivi par *Rhizopus arrhizus* (0,76 %) et *R. stolonifer* (0,57 %) tandis que la présence d'*Absidia glauca* (0,16 %) est inférieure par comparaison au reste

des champignons. *Mucor hiemalis* et *Rhizopus arrhizus* dominent dans les sols de la rhizosphère et de la non-rhizosphère. Par contre, le pourcentage de fréquence d'*Absidia glauca* est le moins important par rapport aux autres champignons dans les deux couches.

Martin (1950) a trouvé que plus le pourcentage de matériau à base d'hydrate de carbone facilement décomposable, de sucres, d'amidons et de certains matériaux hemicellulosiques est élevé, plus la présence de *Mucor* et de *Rhizopus* est importante. Dans cette étude, le pourcentage de fréquence et le nombre des espèces de *Mucor* et de *Rhizopus* sont plus élevés que ceux d'autres organismes.

Ascomycotina :

Au total, on enregistre quatre espèces de champignons dépendant de quatre genres dans la rhizosphère et la non-rhizosphère. Le pourcentage moyen total de fréquence est élevé pour *Neurospora sitophila* (1,63 %) et *Ascostricha chartarum* (0,85 %) tandis qu'*Emericella ruber* est le moins présent (0,24 %). Dans la non-rhizosphère on isole trois espèces appartenant à trois genres différents. *Chaetomium cochlioides* est absent de cette couche. *Neurospora sitophila* domine dans les deux couches tandis qu'*Emericella ruber* est le moins présent dans les deux couches par comparaison au reste des champignons (Tableau II).

Champignons mitosporiques :

On enregistre soixante quatorze espèces fongiques appartenant à vingt neuf genres dans la rhizosphère et la non-rhizosphère. Le sol de la rhizosphère possède la population fongique la plus élevée par comparaison à la non-rhizosphère (Tableau III). On enregistre la moyenne totale maximum de 0,23 % par gramme de sol pour *Aspergillus niger*, suivi par *Aspergillus clavatus* (0,21 %) tandis que la présence de *Polyschema clavatus* (0,01 %) est moins importante par comparaison au reste des champignons. Dans la non-rhizosphère, on enregistre soixante dix espèces appartenant à vingt et un genres. On n'enregistre pas *Aspergillus terricola* var. *americana*, *Monodictys castanae*, *Phialophora richardsiae* et *Polyschema clavulata* dans la non-rhizosphère.

Dans plusieurs études antérieures, on a généralement observé la présence d'*Aspergillus* en abondance dans les sols tropicaux et subtropicaux (Rama Rao, 1970 ; Domsh et Gams, 1972). La population fongique est plus importante dans le sol de la rhizosphère pendant toutes les saisons par comparaison au sol de la non-rhizosphère, ce qui pourrait être dû à la présence de nutriments plus riches de la plante soit par les sécrétions de la racine soit par les cellules rejetées par les racines (Padma & Sudershana, 1975 ; Sing et Sing, 1982 ; Das et coll., 2004). Il est clairement établi d'après les résultats, que les populations fongiques dans les sols de la rhizosphère et de la non-rhizosphère diffèrent à la fois sur le plan qualitatif et quantitatif. Peut-être parce que certaines préfèrent un type particulier de matière organique présente dans cette zone ou bien qu'elles ne disposent pas de la capacité saprophytique compétitive pour combattre les substances antibiotiques / toxiques produites par les autres mycoflores et / ou plantes du sol (Mahmood Khalid et coll., 2006).

Comparaison de la mycoflore du sol de la rhizosphère et de la non-rhizosphère par rapport aux saisons :

La rhizosphère de la plante est un environnement dynamique où de nombreux facteurs peuvent affecter la structure et la composition des espèces des communautés microbiennes qui colonisent les racines. On sait déjà que les communautés de la rhizosphère varient dans l'espace et rayonnent à partir de la surface de la racine y compris dans les zones de l'endorhizosphère, du rhizoplane et de la rhizosphère (Balasubramanian et coll., 1970 ; Garret 1965 ; Gochenaur, 1975 ; Campbell et coll., 1997 ; Grayston et coll., 1999 et Lemanceau et coll., 1995) ainsi que dans des endroits spécifiques de la racine le long de l'axe de la racine. Les communautés microbiennes associées à la rhizosphère varient aussi en fonction de l'espèce de plante, du type de sol et des pratiques culturales, telles que la rotation des cultures ou le labourage. Il est fondamental de comprendre la structure et la composition

des espèces de ces communautés pour comprendre comment les processus biologiques du sol sont influencés par les facteurs environnementaux.

Absidia glauca n'est présent qu'en hiver à la fois dans la zone de la rhizosphère et de la non-rhizosphère tandis que les espèces *Mucor* et *Rhizopus* sont présentes pendant toutes les saisons et elles s'avèrent donc s'adapter à des fluctuations de température variée. *Neurospora sitophila* est présent toute l'année et la fréquence de sa présence est plus importante en hiver et pendant la saison des pluies. *Chaetomium cochlioides* est présent en été tandis qu'on n'observe *Ascotricha chartarum* qu'en hiver (Tableau II, Fig. 1). La densité de certaines des populations fongiques présente des fluctuations en fonction des changements saisonniers et aussi en fonction des nutriments facilement assimilables.

On enregistre les espèces d'*Aspergillus terricola* var. *americana*, *A. versicolor*, *Cladosporium elatum*, *C. herbarum*, *C. sphaerospermum*, *M. subsimplex*, *Paecilomyces varioti* et *Veronea coprophila* en hiver et pendant la saison des pluies. *Humicola grisea*, *Paecilomyces carneus* et *Scolecobasidium variable* ne sont présents qu'en été. Les espèces comme *Alternaria alternata*, *Apergillus amstelodami*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus rugulosus*, *Aspergillus sydowi*, *Cladosporium oxysporum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia pallescens*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium variable*, *Spicaria fusispora*, *Taeoniolella alta*, *Torula herbarum* f. *quaternella*, *Trichoderma lignorum* et *Pestalotiopsis guepini* s'adaptent aux diverses fluctuations de température et on les trouve donc pendant toutes les saisons (Tableau III, Fig. 1). L'isolement de ces champignons dans les deux zones et surtout de ceux qui sont le plus fréquents montre qu'ils sont physiologiquement et génétiquement plus versatiles, non seulement pour affronter la rigueur du climat mais ils ont aussi un système enzymatique perfectionné pour dégrader la matière organique de nature variée et ils résistent très bien aux substances polluantes du sol comme les métaux lourds, les herbicides et les antibiotiques produits par d'autres champignons et / ou plantes (Mahmood Khalid et coll., 2006 ; Shalaby et coll., 2002 ; Baig et coll., 2003 ; Lebedeva et coll., 1999).

La présence de champignons dans le sol de la muraie témoigne d'une incidence saisonnière manifeste (Tableaux I, II et III). Pendant l'été, quand l'humidité du sol est très faible, les comptes en champignons sont également faibles, parce que les spores sont au repos, ce qui entraîne donc un faible volume de champignons pendant la saison chaude. Dans cette étude, la population de champignons diminue aussi en été, la dessiccation pouvant être responsable d'une telle diminution. Usha et coll., (2002) et Das et coll., (2004) ont aussi rapporté des résultats similaires. En revanche on enregistre la population de mycoflore la plus élevée en hiver dans la couche superficielle (Tableau I, Fig. 1), tandis que pendant la saison des pluies, on trouve surtout la population de champignons à 15cm de profondeur, parce que les spores de la couche superficielle sont chassées par l'eau. Cela confirme les conclusions de Shree et Boriah (1987) ; Basumatary et coll., (2004) et de Rahman et coll., (2004) qui ont observé des faits similaires.

Efficacité des différents milieux pour isoler la mycoflore du sol :

L'utilisation d'un milieu unique est encore un facteur limitatif pour plusieurs champignons. Donc, au cours de cette étude en plus de l'agar de nitrate de saccharose de Czapek et de l'agar de peptone de dextrose, on a aussi utilisé un milieu faible tel que l'agar d'extrait de levure. Ce milieu faible, supprime la croissance des champignons qui poussent vite et les champignons qui croissent lentement ont la chance d'apparaître sur les plaques. En plus de ces milieux, on utilise des milieux comme l'agar de dextrose de pomme de terre, l'agar d'extrait de malt et l'agar d'extrait de levure de cellulose.

L'utilisation de différents milieux c'est à dire le PDA, le CZA, le MEA, le YEA, le DPA et le CMA entraîne l'isolement de différentes espèces (Fig. 2).

Chez les Zygomycotina, on isole 9 espèces représentant 4 genres en utilisant les différents milieux. Les nombres d'espèces isolées dans des milieux particuliers sont 4 espèces dans du PDA, 4 espèces dans le CZA, 2 espèces dans le MEA, 1 espèce dans le YEA et 1 espèce dans le DPA, tandis que dans le milieu CMA, on ne trouve aucune espèce (Fig. 2).

Chez les Ascomycotina, on a isolé 4 espèces en utilisant tous les milieux. En utilisant le PDA, on isole 1 espèce, 1 espèce avec le CZA, 4 espèces avec le MEA, 1 espèce avec le YEA et 2 espèces avec le CMA. Aucune espèce d'Ascomycotina ne croît sur DPA (Fig. 2).

Au total, on isole 74 espèces représentant 29 genres de champignons mitosporiques en utilisant tous les milieux. On isole 36 espèces sur du milieu PDA, 23 espèces sur du CZA, 44 espèces sur du MEA, 7 espèces sur du YEA, 9 espèces sur du DPA et 3 espèces sur du CMA (Fig. 2).

On isole le nombre maximum d'espèces sur les milieux d'agar d'extrait de malt. Au total, on isole 87 espèces en utilisant ces milieux, ce qui est un nombre assez important pour ces environnements. Cela est possible grâce à l'utilisation de différents milieux. Cela pourrait être dû à la compatibilité du milieu ou aux facteurs de dilution.

On peut attribuer en grande partie la différence de résultats obtenue avec les différents milieux et méthodes utilisés à la différence de dilutions utilisées ou à d'autres facteurs qui sont importants et ne sont pas connus tels que l'échec possible de certains champignons à entrer dans des suspensions de sol (Warcup, 1957).

On a rapporté que les dilutions de sol et les procédures d'ensemencement permettent d'obtenir de nombreux genres de champignons provenant de la rhizosphère de plantes médicinales indigènes et on constate que le plus grand pourcentage d'entre eux est capable d'une croissance maximum sur un simple milieu de glucose et de sels et dans des milieux supplémentés avec des acides aminés contrairement aux champignons provenant d'un sol ne contenant pas de racines (Elroy et Bryan, 1986).

Azaz et Hazenekoglu (1997) ont isolé des micro-champignons d'échantillons du sol avant l'irrigation. Les genres les plus riches en termes de nombre d'espèces sont *Apergillus* (25 espèces), *Penicillium* (22 espèces), *Acremonium* (7 espèces) et *Fusarium* (6 espèces). Bien qu'*Aspergillus* ait le plus grand nombre d'espèces, *Penicillium* présente la formation la plus abondante sur le plan quantitatif de colonies dans les taxa et il y a une augmentation des propagules du microchampignon dans 1 g de sol séché au four équivalente à celle de microchampignons provenant de sol frais irrigué.

Hasenekoglu (1985) a procédé à une analyse quantitative de la flore des microchampignons provenant de l'herbe de la forêt et du sol de champs dans les environs de Sarikamis. Il a constaté dans son étude que le genre *Penicillium* est le plus courant en termes d'espèces et d'intensité.

Asan (1994) a étudié la flore de *Penicillium* et d'*Aspergillus* dans différents habitats du sol à Edirne. Il a trouvé 23 espèces et deux variétés appartenant à *Aspergillus* et 16 espèces appartenant à *Penicillium*.

Sukun & Hasenokoglu (1993) ont recherché la flore de *Penicillium* et d'*Aspergillus* dans le nord-est de l'Anatolie. Dans leur étude, ils ont trouvé 20 espèces d'*Aspergillus* et 22 de *Penicillium*.

Les résultats de ces études réalisées dans différentes régions de Turquie sont en accord avec ceux de notre recherche. Ils prouvent que le genre *Penicillium* est très courant dans le sol.

Ismail et Abdullah (1977) ont réalisé une étude sur le sol en Irak où les facteurs climatiques et édaphiques sont très similaires à ceux de notre recherche sur le terrain.

FORMULATION OF MEDIUM TO REDUCE THE COST OF *IN VITRO* MICROPROPAGATION OF MULBERRY

R. KAVYASHREE¹, M. C. GAYATRI² & H. M. REVANASIDDAIAH³

1, 2. Plant Biotechnology Unit, Annexe-Department of Botany, Bangalore University, Bangalore – 560 056. (E-mail: cavya@yahoo.com¹, gayatrimc@hotmail.com²)

3. Silkworm Genetics and Breeding laboratory, Department of Zoology, Bangalore University, Bangalore – 560 056., India.

A new liquid medium was formulated using small glass beads as alternative source for gelling agent agar to reduce the cost of in vitro micropropagation. The cost of the Small Glass Bead based Liquid Culture Medium (SGBLCM) was found to be Rs. 10.868304 (0.25 US \$) per litre when compared to Rs. 21.628304 (0.50 US \$) for Murashige and Skoog's Basal Medium (MSBM), thus reducing the cost of the medium by 49.74%. The multiplication rate of 1:4 was observed on both the media tried during first cycle. Thereafter, for every subculture there was 2-fold increase in the rate of multiplication, which declined in the 4th and 5th multiplication cycles. The cost per in vitro plant using SGBLCM is Re. 0.02 (0.0004 US \$) when compared to that of MSBM, which costs Rs. 0.13 (0.003 US \$) per plant, thereby reducing the cost per plant by 84.61%. The analysis of the results depicts that by using this newly formulated medium, the cost of the in vitro micropropagation can be reduced substantially, which is mainly due to the re-use of small glass beads in multiplication cycles. This protocol can be safely adopted in commercial tissue culture laboratories for large-scale multiplication.

Keywords: Small glass beads, Murashige and Skoog's basal medium, cost reduction, *in vitro* micropropagation, commercial laboratories.

Abbreviations:	MSBM	- Murashige and Skoog's Basal Medium
	SGBLCM	- Small Glass Bead based Liquid Culture Medium
	BAP	- 6-Benzyl Amino Purine
	TIBA	- 2,3,5-Tri Iodo Benzoic Acid

INTRODUCTION

In vitro micropropagation technology has changed considerably during the last two decades of the 20th century. Hitherto, a lot of work has been done on large scale *in vitro* production of many plant systems involving mechanization of existing procedures in commercial tissue culture laboratories throughout the world (Gayatri *et al.*, 2003a, b). At present, few reports are available to reduce the cost of *in vitro* micropropagation using alternative sources for sucrose and agar without much success (Sorvari, 1986; Ichi *et al.*, 1986; Henderson and Kinnersley, 1988). In this direction, it is imperative to develop suitable cost-effective protocols to lower the production cost per plant for rapid rate of clonal propagation of commercially important crop species. Further, the inputs per litre of the basal medium generally reflect on the cost of plant produced particularly the price of agar. Therefore, in the present investigation, small glass bead based liquid culture medium was formulated using cheaper and suitable alternative source small glass beads in place of agar with the main aim of reducing the cost of *in vitro* micropropagation.

MATERIAL AND METHODS

The non-embryogenic vegetative propagule apical bud measuring 1.0–1.5 cm were excised from the ten years old mature plant of mulberry variety-S54 (*Morus indica* L.) during winter after pruning. Apical buds were washed thoroughly in tap water and liquid detergent Labolene 5% (v/v), given a rinse in 70% ethanol for 30 secs, disinfected in 0.1% mercuric chloride (HgCl_2) for 3 mins and rinsed several times in sterile water to remove the traces of mercuric chloride.

The Murashige and Skoog's basal medium (MSBM : agar system) was prepared using Murashige and Skoog's (MS) salts with sucrose and agar. The Small Glass Bead based Liquid Culture Medium (SGBLCM : bead system) was formulated using MS salts with sucrose and 60 g of small glass beads (each bead measuring 1.13 sq cm) per 250 ml culture bottle in place of agar. The culture bottles containing sterilized glass beads with liquid medium were sterilized in an autoclave at the temperature 121°C and 15 lbs/in² pressure for 15 minutes. The cost of MSBM per litre was Rs. 21.628304 (0.50 US\$) and SGBLCM was Rs. 10.868304 (0.25 US \$) based on the lowest cost of its various ingredients and small glass beads (Table I). By dispensing 50 ml of MSBM and 15 ml of SGBLCM, 20 and 66 bottles can be obtained from one litre of medium respectively. However, for the present experiment 10 bottles each of agar and bead systems were utilized to analyze the multiplication cost of mulberry per plant basis in all the cycles.

Aseptic apical buds were cultured on small glass bead based liquid culture medium and also on MSBM fortified with BAP (2 mg l⁻¹) and TIBA (1 mg l⁻¹). The culture bottles were closed with plastic caps and sealed with klin wrap. These experimental culture bottles were maintained in the culture room at a temperature 25 ± 2°C with photon flux density of 30-50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ under photoperiodic regime of 16 h light and 8 h dark cycle. Further, the shoots that developed from the apical bud were subcultured for 5 cycles at regular intervals on MSBM and SGBLCM to study their multiplication potential. The well developed plants were hardened and transferred to the field.

RESULTS

The non-embryogenic vegetative propagule apical bud was cultured on MSBM and SGBLCM fortified with BAP (2 mg l⁻¹) and TIBA (1 mg l⁻¹) to study their micropropagation potential. After 35 days of culture, 1:4 multiple shoots with roots was observed on agar and bead system during first cycle. The multiple shoots obtained from the first cycle were subcultured on the same media for large scale multiplication. It was found that in the 2nd and 3rd subcultures there was a 2-fold increase in the rate of multiplication, which declined substantially after the 4th cycle. At the end of the third cycle 240 *in vitro* plants were obtained on MSBM and SGBLCM (Table II). The well developed plantlets were hardened and successfully established in field with 92% survival frequency.

The cost of the gelling agent agar per litre of the basal medium is Rs. 14.72 (0.32 US \$) and accounts for 68.06% of the total media cost. It was calculated that the cost of the small glass beads per litre medium would be Rs. 3.96 (0.09 US \$), thereby reducing the cost of gelling agent by 73.09% in the multiplication medium. Further, the cost of MSBM per litre is Rs. 21.628304 (0.50 US \$), whereas the cost of SGBLCM per litre is 10.868304 (0.25 US \$) (Table I).

The cost of the small glass beads based liquid culture medium for 3 cycles (30 bottles – 450ml medium) was found to be Rs. 4.89 (0.11 US \$) for 240 *in vitro* plants and the cost per *in vitro* plant is Re. 0.02 (0.0004 US \$), whereas the cost of MSBM for 3 cycles (30 bottles – 1500 ml medium) to retrieve 240 plants is Rs. 32.44 (0.75 US \$) and the cost per *in vitro* plant is Re. 0.13 (0.003 US \$), thereby reducing the overall cost per plant by 84.61% after 3 cycles (Table II). This is due to the use of small glass beads again and again in the liquid culture medium during *in vitro* cycles.

Table I. Comparative cost analysis of Murashige and Skoog's basal medium and Small Glass Bead based Liquid Culture medium for *in vitro* micropropagation of mulberry.

Tableau I. Analyse de coût comparative du milieu de base de Murashige et Skoog et de la culture liquide avec de petites billes de verre pour la micro-multiplication du mûrier in vitro.

Ingredients of basal media	Quantity (mg/l.)	Minimum priced chemicals used for MSBM* (Re)	Minimum priced chemicals used for SGBLCM* (Re)	Suppliers
<i>Ingrédients des milieux de base</i>	<i>Quantité (mg/l.)</i>	<i>Produits chimiques à prix minimum utilisés pour le MSBM* (Re)</i>	<i>Produits chimiques à prix minimum utilisés pour le SGBLCM* (Re)</i>	<i>Fournisseurs ***</i>
KNO ₃	1900	0.342000	0.342000	R
NH ₄ NO ₃	1650	0.273900	0.273900	R
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	0.072160	0.072160	R
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	0.050320	0.050320	R
KH ₂ PO ₄	170	0.056620	0.056620	SDF
Na ₂ .EDTA	37.3	0.027602	0.027602	R
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8	0.003669	0.003669	SDF
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	0.004549	0.004549	R
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	0.001634	0.001634	R
H ₃ BO ₃	6.2	0.001574	0.001574	SDF
KI	0.83	0.002191	0.002191	R
NaMO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.000392	0.000392	Q
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.000006	0.000006	SDF
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.000083	0.000083	SDF
Myo-inositol	100	0.663000	0.663000	SDF
Nicotinic acid / <i>Acide nicotinique</i>	0.5	0.000795	0.000795	SDF
Pyridoxine HCl	0.5	0.005385	0.005385	SDF

Tableau I. (Continued...).
Tableau I. (Suite...).

Ingredients of basal media	Quantity	Minimum priced chemicals used for MSBM* (Re)	Minimum priced chemicals used for SGBLCM* (Re)	Suppliers
<i>Ingrédients des milieux de base</i>	<i>Quantité (mg/lt.)</i>	<i>Produits chimiques à prix minimum utilisés pour* le MSBM (Re)</i>	<i>Produits chimiques à prix minimum utilisés pour le SGBLCM* (Re)</i>	<i>Fournisseurs ***</i>
Thiamine HCl	0.1	0.000900	0.000900	Q
Glycine	2.0	0.001524	0.001524	SDF
SUCROSE	300000	5.4	5.4	SDF
AGAR	8000	14.72	-	R
GLASS BEADS / <i>BILLES DE VERRE</i>	3960000	-	3.96	
Total cost of the medium (Rs.) / <i>Coût total du milieu (Rs.)</i>		21.628304	10.868304	
Total cost of the medium / <i>Coût total du milieu (US\$) **</i>		0.50	0.25	
Agar % in the medium / <i>% d'agar dans le milieu</i>		68.06%	-	
Reduction in Agar cost (%) / <i>Diminution du coût de l'agar (%)</i>			73.09%	
Reduction in total cost of media (%)			49.74%	
<i>Diminution du coût total du milieu (%)</i>				
Cost per plant in Rupee / <i>Coût par plant en roupies</i>		1 : 0.13	1 : 0.02	
Cost per plant in US \$ / <i>Coût par plant en US \$</i>		1 : 0.003	1 : 0.0004	
Reduction in cost per plant (%) / <i>Diminution du coût par plant (%)</i>			84.61%	

* MSBM: Murashige and Skoog's Basal Medium / *Milieu de base de Murashige et Skoog;*

SGBLCM: Small Glass Bead based Liquid Culture Medium / *Milieu de culture liquide à base de petites billes de verre.*

** 1 US \$ = Rs. 43

*** Q : Qualigens ; SDF : S.D.Fine ; R : Ranbaxy.

Table II. Multiplication rate, number of axenic plants retrieved, cost of the media and cost per plant after 3 multiplication cycles of mulberry in MSBM* and SGBLCM.**

Tableau II. Taux de multiplication, nombre de plants axéniques obtenus, coût des milieux et coût par plant après 3 cycles de multiplication du mûrier dans du MSBM et du SGBLCM**.*

Media	Multiplication rate	No. of <i>in vitro</i> plants after each cycle					Cost of medium for 3 cycles (Rs)	Cost per plant after 3 cycles	Reduction in cost per plant (%)
		I Cycle	II Cycle	III Cycle	IV Cycle	V Cycle			
		<i>Nbre de plants in vitro après chaque cycle</i>							
<i>Milieux</i>	<i>Taux de multiplication</i>	<i>Cycle I</i>	<i>Cycle II</i>	<i>Cycle III</i>	<i>Cycle IV</i>	<i>Cycle V</i>	<i>Coût du milieu pour 3 cycles (Rs)</i>	<i>Coût par plant après 3 cycles</i>	<i>Diminution du coût par plant (%)</i>
MSBM	1:4	40	80	120	82	68	4.890 (0.11 US \$) (30 bottles – 1500 ml) (30 bouteilles – 1500 ml)	0.13 (0.003 US \$)	
SGBLCM	1:4	40	80	120	79	63	9.732 (0.22 US \$) (30 bottles – 450 ml) (30 bouteilles - 450 ml)	0.02 (0.0004 US \$)	84.61%

* MSBM: Murashige and Skoog's Basal Medium / *Milieu de base de Murashige et Skoog.*

** SGBLCM: Small Glass Bead based Liquid Culture Medium / *Milieu de culture liquide à base de petites billes de verre.*

DISCUSSION

In developing countries, the cost of the media is the major component of production expenditure when compared to wages, whereas in the western world, wages forms the major cost component for *in vitro* micropropagation of plants in commercial laboratories. In this direction, more emphasis is given in the present study towards modifying the existing nutrient medium and formulating alternative in order to reduce the cost of micropropagation and ensure the production of maximum number of plants in a relatively short period of time.

Literature quoted so far is pertaining to *in vitro* multiplication using different nutrient media. There is no documentary evidence on the cost reduction of *in vitro* plants of mulberry, except our earlier papers, which reports the usage of eating sugar and laundry starch:potato powder:semolina as alternative source for sucrose and agar respectively for micropropagation of mulberry variety Berhampore local and ginger (Gayatri *et al.*, 2003a, b).

In the present study, it was interesting to note that the glass beads can safely replace the gelling agent agar for *in vitro* micropropagation of mulberry. It was found that for every cycle there was 2-fold increase in multiplication rate, which declined after the 3rd cycle. This agrees with the findings of Schulze (1988) who suggested that the most important factor influencing the cost of micropropagation is how quickly plant number can be increased. The rate at which plants can be produced per unit of time from explant is dependent on increase in the number of shoots of a suitable size or the stage of development during the course of subcultures. The greater the multiplication co-efficient, the shorter the interval between subcultures, the cheaper will be the cost of plants resulting from the protocol. Further, it was found in the present study that the use of a liquid medium instead of semi solid medium not only saves the cost of adding gelling agent, but also reduces the cost of washing and cleaning bottles, thus reducing the cost of media. This coincides with the findings of De Fossard (1977).

The result of the present investigation clearly indicates that the cost of the *in vitro* propagated plants can be reduced substantially by using bead system after 3 multiplication cycles. This is due to the fact that in bead system, 450ml of liquid medium is dispensed to 30 bottles required for 3 cycles, whereas in agar system 1500ml of medium is required for 30 bottles for 3 cycles thereby reducing the cost per plant by 84.61%. This agrees with the findings of Soczek and Hempel (1988) who have reported that simplified media can contribute towards reduction of *in vitro* propagation cost.

The use of small glass beads as an alternative and cost-effective source in place of gelling agent agar is reported for the first time. Further, the same small glass beads can be re-used in the liquid culture medium for infinite number of *in vitro* cycles. The present finding indicates that even if the profit margins, capital expenditure and overheads are not reduced, it is possible to reduce the cost of *in vitro* plants taking advantage of this unique modified medium. This protocol will apparently have far reaching implication on commercial tissue culture laboratories. Further refinement of this protocol may even replace the existing agar system for large scale commercial micropropagation.

REFERENCES

- DE FOSSARD R.A., (1977). Tissue culture in horticulture – A perspective. *Acta Hort.* 166 : 63-92.
- GAYATRI M.C., REVANASIDDAIAH H.M. & KAVYASHREE R., (2003a). A protocol to reduce the cost of *in vitro* propagated plants of mulberry. *Sericologia*, 43(1) : 109-115.
- GAYATRI M.C., SEEMA PRAKASH & KIRAN S., (2003b). A protocol to reduce the cost nutrient media for large scale multiplication of ginger. *J. Curr. Sci.*, 3(1) : 177-180.
- HENDERSON W.E. & KINNERSLEY A.M., (1988). Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.*, 15 : 17 - 22.
- ICHI T., KODA T., ASAI I., HATANAKA A. & SEKIY J., (1986). Effect of gelling agent on *in vitro* culture of plant tissues. *Agric. Biol. Chem.*, 50 : 2397 - 2399.

- SCHULZE D., (1988). *Saintpaulia inonantha* H. Wendl. — *In vitro* propagation and acclimatization in a commercial laboratory. Acta Hort., 226: 619-622.
- SOCZEK U. & Hempel, M., (1988). The influence of some organic medium compounds on multiplication of gerbera *in vitro*. Acta Hort., 226: 643-646.
- SORVARI S. (1986). The effect of starch gelatinized nutrient media in barley anther cultures. Ann. Agric. Fenn., 25 : 135 – 138.

FORMULATION D'UN MILIEU PERMETTANT LA DIMINUTION DU COUT DE LA MICROMULTIPLICATION DU MURIER *IN VITRO*

R. KAVYASHREE¹, M. C. GAYATRI² & H. M. REVANASIDDAIAH³

- 1, 2. Plant Biotechnology Unit, Annexe-Department of Botany, Bangalore University, Bangalore - 560 056. (E-mail : cavya@yahoo.com¹, gayatrimc@hotmail.com²)
3. Silkworm Genetics and Breeding Laboratory, Department of Zoology, Bangalore University, Bangalore - 560 056, Inde.

*On a formulé un nouveau milieu liquide en utilisant de petites billes de verre comme source alternative au gel d'agar pour diminuer le coût de la micro-multiplication *in vitro*. Le coût du Milieu de Culture Liquide à base de Petites Billes de Verre (SGBLCM) s'avère être de 10,86 Rs. (0,25 US \$) par litre par comparaison à 21,62 Rs. (0,50 US \$) pour le Milieu de Base de Murashige et Skoog (MSBM), ce qui diminue donc le coût du milieu de 49,74 %. On observe le taux de multiplication de 1 : 4 sur les deux milieux testés pendant le premier cycle. Par la suite, pour chaque sous-culture, on constate un taux de multiplication qui est deux fois plus élevé et qui baisse pour les 4^{ème} et 5^{ème} cycles de multiplication. Le coût par plant *in vitro* en utilisant le SGBLCM est de 0,02 Rs. (0,0004 US \$) par comparaison à 0,13 Rs. (0,003 US \$) par plant pour le MSBM, ce qui diminue donc le coût par plant de 84,61 %. L'analyse des résultats montre qu'en utilisant ce milieu, on peut considérablement diminuer le coût de la micro-multiplication *in vitro*, ce qui est principalement dû à la réutilisation des petites billes de verre au cours des cycles de multiplication. On peut adopter ce protocole sans risquer dans les laboratoires de culture commerciale des tissus pour la multiplication à grande échelle.*

Abréviations :	MSBM	Milieu de base de Murashige et Skoog
	SGBLCM	Milieu de Culture Liquide à base de petites billes de verre
	BAP	6-Benzyl Amino Purine
	TIBA	2,3,5- Acide tri-iodo benzoïque

INTRODUCTION

La technologie de la micro-multiplication *in vitro* a considérablement changé au cours des deux dernières décennies du 20^{ème} siècle. Jusqu'à présent, beaucoup de travaux ont été entrepris sur la production *in vitro* à grande échelle de systèmes de plantes grâce à la mécanisation des procédures existantes dans les laboratoires de culture commerciale des tissus dans le monde entier (Gayatri et coll., 2003, b). A présent, il existe quelques rapports qui n'ont pas été très fructueux sur la diminution du coût de la micro-multiplication en utilisant des sources alternatives au saccharose et à l'agar (Sorvari, 1986 ; Ichi et coll., 1986 ; Henderson et Kinnersley, 1988). Dans cette optique, il est impératif de mettre au point des protocoles rentables et adaptés pour diminuer le coût de production par plant permettant d'obtenir un taux rapide de multiplication clonale des espèces de plantes importantes sur le plan commercial. Les apports de milieu de base par litre ont en général une répercussion sur le coût par plant produit, en particulier le prix de l'agar. Dans cette étude, nous avons donc formulé un milieu de culture liquide en utilisant une source alternative, adaptée et meilleur marché, au gel d'agar, en l'occurrence des petites billes de verre, dans le but de diminuer le coût de la micro-multiplication *in vitro*.

MATERIELS ET METHODES

On excise le propagule végétatif du bourgeon apical non embryogène, mesurant 1 à 1,5 cm, d'un plant mature de dix ans de la variété de mûrier S-54 (*Morus indica* L.) pendant l'hiver après la taille. On lave les bourgeons apicaux soigneusement à l'eau du robinet et avec du détergent liquide Labolene à 5 % (v/v), on les rince dans de l'éthanol à 70 % pendant 30 secondes, on les désinfecte dans du chlorure de mercure à 0,1 % (HgCl_2) pendant 3 minutes et on les rince plusieurs fois dans de l'eau stérile pour retirer les traces de chlorure mercurique.

On prépare le milieu de base de Murashige et Skoog (MSBM : système agar) en utilisant des sels de Murashige et Skoog (MS) avec du saccharose et de l'agar. On formule le Milieu de Culture Liquide à base de Petites Billes de Verre (SGBLCM : système de billes) en utilisant des sels MS avec du saccharose et 60 g de petites billes de verre (chaque bille mesure $1,13 \text{ cm}^2$) pour une bouteille de culture de 250 ml à la place de l'agar. On stérilise les bouteilles de culture contenant des billes de verre stérilisées et un milieu liquide dans un autoclave à la température de 121°C et à $15 \text{ lbs} / \text{in}^2$ de pression pendant 15 minutes. Le coût du MSBM par litre est de 21 628 304 Rs (0,50 US\$) et du SGBLCM est de 10 868 304 Rs (0,25 US\$) d'après le coût le plus bas des différents ingrédients et des petites billes de verre (Tableau I). On peut obtenir respectivement 20 et 66 bouteilles à partir d'un litre de milieu et en utilisant 50 ml de MSBM et 15 ml de SGBLCM. Cependant, pour cette expérience, on utilise 10 bouteilles pour chaque méthode, agar et billes, pour analyser le coût de multiplication du mûrier sur la base d'un plant pour tous les cycles.

On cultive les bourgeons apicaux sur un milieu de culture liquide à base de petites billes de verre et aussi sur du MSBM fortifié avec du BAP (2 mg l^{-1}) et du TIBA (1 mg l^{-1}). On ferme les bouteilles de culture avec des bouchons en plastique et on les entoure de film plastique. On maintient ces bouteilles de culture expérimentale dans la pièce de culture à une température de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ avec une densité du flux de photons de $30\text{-}50 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ sous un régime photopériodique d'un cycle de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité. De plus, on place les pousses, qui se sont développées à partir du bourgeon apical, en sous-culture pendant 5 cycles à des intervalles réguliers sur du MSBM et du SGBLCM pour étudier leur potentiel de multiplication. Les plants bien développés durcissent et sont transférés sur le terrain.

RESULTATS

On cultive les propagules végétatifs non embryogènes du bourgeon apical sur du MSBM et du SGBLCM fortifié avec du BAP (2 mg l^{-1}) et du TIBA (1 mg l^{-1}) pour étudier leur potentiel de micro-multiplication. Après 35 jours de culture, on observe 1 : 4 pousses multiples avec des racines sur l'agar et le système de billes pendant le premier cycle. On place les pousses multiples obtenues pendant le premier cycle en sous-culture sur le même milieu pour la multiplication à grande échelle. Il s'avère que pendant les 2^{ème} et 3^{ème} sous-cultures, le taux de multiplication double, puis il baisse considérablement après le 4^{ème} cycle. A la fin du troisième cycle, on obtient 240 plants *in vitro* sur le MSBM et le SGBLCM (Tableau II). Les plants bien développés durcissent et s'établissent avec succès sur le terrain avec une fréquence de survie de 92 %.

Le coût de l'agar gélifiant par litre de milieu de base est de 14,72 Rs. (0,32 US\$) et il représente 68,06 % du coût total du milieu. On calcule que le coût des petites billes de verre par litre de milieu est de 3,96 Rs. (0,09 US\$), ce qui diminue par-là même le coût du gélifiant dans le milieu de multiplication de 73,09 %. De plus, le coût du MSBM par litre est de 21 628 304 Rs (0,50 US\$), tandis que le coût du SGBLCM par litre est de 10 868 304 (0,25 US\$) (Tableau I).

Il s'avère que le coût du milieu de culture liquide avec les petites billes de verre pour 3 cycles (30 bouteilles – milieu de 450 ml) est de 4,89 Rs (0,11 US\$) pour 240 plants *in vitro*, le coût par plant *in vitro* étant de 0,02 Re. (0,0004 US\$), tandis que le coût du MSBM pour 3 cycles (30 bouteilles – milieu de 1500 ml) pour obtenir 240 plants est de 32,44 Rs (0,75 US\$) et le coût par plant *in vitro*

de 0,13 Re. (0,003 US \$). Le coût total par plant après 3 cycles dans le milieu avec les billes est donc inférieur de 84,61 % (Tableau II) Cela est dû au fait que l'on peut utiliser les petites billes de verre de nombreuses fois dans le milieu de culture liquide pendant les cycles *in vitro*.

DISCUSSION

Dans les pays en voie de développement, le milieu de culture des plants *in vitro* est le principal élément de coût pour les dépenses de production par comparaison aux salaires, tandis que dans le monde occidental, les salaires forment le principal élément de coût pour la micro-multiplication *in vitro* de plants dans les laboratoires commerciaux. Dans cette optique, nous avons plus mis l'accent sur la modification du milieu nutritif actuel et sur la formulation d'une alternative dans le but de diminuer le coût de la micro-multiplication et de s'assurer de la production d'un nombre maximum de plants dans une période de temps relativement courte.

La littérature publiée jusqu'à présent concerne la multiplication *in vitro* en utilisant différents milieux nutritifs. Il n'existe pas d'étude sur la diminution du coût des plants de mûrier *in vitro*, sauf dans nos articles précédents, qui sont des rapports sur l'utilisation du sucre comestible et d'amidon : de poudre de pomme de terre : semoule comme source alternative respectivement au saccharose et à l'agar pour la micro-multiplication de la variété de mûrier Berhampore local et ginger (Gayatri et coll., 2003a, b).

Dans cette étude, il est intéressant de noter que les billes de verre peuvent remplacer l'agar gélifiant sans risque pour la micro-multiplication *in vitro* du mûrier. Il s'avère que pour chaque cycle le taux de multiplication double, puis il baisse après le 3^{ème} cycle. Ceci est en accord avec les résultats de Schulze (1988) qui a suggéré que le facteur le plus important qui influence le coût de la micro-multiplication est la rapidité avec laquelle le nombre de plants peut augmenter. Le rythme auquel les plants peuvent être produits à partir de l'explant par unité de temps dépend de l'augmentation du nombre de pousses d'une taille adaptée ou du stade de développement au cours des sous cultures.

Plus le coefficient de multiplication est élevé, plus l'intervalle entre les sous-cultures est court, plus le coût des plants obtenus avec le protocole est meilleur marché. En outre, dans cette étude il s'avère que l'utilisation de milieu liquide à la place d'un milieu semi-solide permet non seulement d'économiser le coût de l'ajout d'un gélifiant mais diminue aussi le coût de rinçage et de nettoyage des bouteilles, ce qui diminue le coût du milieu. Ceci coïncide avec les résultats de De Fossard (1977).

Les résultats de cette étude montrent clairement que l'on peut considérablement diminuer le coût de multiplication des plants *in vitro* en utilisant le système de billes pendant 3 cycles de multiplication. Cela est dû au fait qu'avec le système de billes, on utilise 450 ml de milieu liquide pour 30 bouteilles nécessaires à 3 cycles, tandis qu'avec le système agar, il faut 1500 ml de milieu pour 30 bouteilles nécessaires à 3 cycles, ce qui diminue donc le coût par plant de 84,61 %. Cela est en accord avec les résultats de Soczek et Hempel (1988) qui ont rapporté que des milieux simplifiés peuvent contribuer à la diminution du coût de multiplication *in vitro*.

Cette étude est le premier rapport sur l'utilisation de petites billes de verre comme source alternative et rentable à l'agar gélifiant. Par ailleurs, on peut réutiliser les mêmes petites billes de verre dans le milieu de culture liquide pendant un nombre infini de cycles *in vitro*. Nos résultats montrent que même si les marges de profit, les dépenses de capital et les frais généraux ne diminuent pas, il est possible de diminuer le coût des plants *in vitro* en profitant de ce milieu unique modifié. Ce protocole aura sûrement des implications d'une portée considérable pour les laboratoires de culture commerciale des tissus. Le perfectionnement de ce protocole pourrait même conduire au remplacement du système agar actuel pour la micro-multiplication commerciale à grande échelle.

INTENSITY OF POWDERY MILDEW DISEASE CAUSED BY *PHYLLACTINIA CORYLEA* IN MULBERRY AND ITS MANAGEMENT

S. MANIMEGALAI, N. CHANDRAMOHAN & C. A. MAHALINGAM

Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore - 641 003,
Tamil Nadu, India.

*The intensity of powdery mildew disease caused by *Phyllactinia corylea* on different genotypes of mulberry ranged from 0.77 to 22.14 per cent. China white recorded significantly lesser incidence (0.77%) followed by commercially exploited varieties, V1 (4.51%) and MR 2 (5.32%). The fungicide, carbendazim 0.2 per cent was effective against *P. corylea* recording Per cent Disease Index (PDI) of 10.40 followed by dinocap, 0.2 per cent (13.45%) compared to 41.47 per cent in untreated control.*

Keywords: Mulberry powdery mildew, *Phyllactinia corylea*, Per cent Disease Index (PDI), Fungicides, *Thuja orientalis*.

INTRODUCTION

Powdery mildew disease of mulberry caused by *Phyllactinia corylea* (Pers) Karst is considered to be serious during the winter months. The disease causes considerable reduction in the leaf quality (Shree and Natarajan, 1993) and quantity (Sullia and Padma, 1987). Feeding of mildew affected leaves reduced the economic characters in mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. Only very few reports are available on the severity of the disease and its management especially under Tamil Nadu conditions. Hence an attempt was made to study the disease incidence on important genotypes and commercially exploited varieties of mulberry under Tamil Nadu conditions in order to find out effective botanicals and fungicides for the management of the disease.

MATERIALS AND METHODS

To study the severity of the disease, observations were made on the incidence of *P. corylea* on important genotypes and commercially exploited varieties of mulberry in the germplasm garden maintained at the Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore. PDI was recorded for four consecutive years, i. e., 2002-03, 2003-04, 2004-2005 and 2005-06 during the November, December and January months where the intensity was higher. In each genotype, 25 plants in three locations were examined for estimating the Disease Index Percentage. The infected leaves were graded based on the disease intensity.

Grade 1 = No disease,

Grade 2 = 1-5 % leaf area affected,

Grade 3 = 6 to 20 % leaf area infected,

Grade 4 = 21 to 50 % leaf area affected,

Grade 5 = 51 % and above leaf area infected. The Per cent Disease Index(PDI) was calculated using the formula

$$\text{PDI} = \frac{\text{Sum of all numerical rating (grades)}}{\text{Total number of leaves} \times \text{maximum disease rating}} \times 100$$

To determine the efficacy of botanical and fungicides, two field experiments were conducted during winter, 2003-04 and winter 2005-06 with Kanva 2 variety of mulberry during the month of December. The experiments were laid out in a randomized block design with seven treatments replicated thrice. The treatments consisted of 0.2 per cent concentrations of chlorothalonil, dinocap, carbendazim, wettable sulphur, tridemorph and *Thuja orientalis* along with untreated control (Water spray). The spraying was given on 35 days after pruning. Observations were made on disease incidence at 10 and 20 days after spraying.

RESULTS AND DISCUSSION

Intensity of powdery mildew:

Observations during various years showed that except during 2004-05, PDI recorded during the remaining years was lower in China white followed by V1 and MR 2. The next best variety was DD 1 (Table I).

Table I. Powdery mildew disease intensity on different genotypes of mulberry.

Tableau I. Intensité de la maladie du mildiou poudreux chez différents génotypes de mûrier.

Percent Disease Index on different genotypes during different periods					
<i>Pourcentage de maladie chez différents génotypes pendant différentes périodes</i>					
Genotypes	2002-03	2003-04	2004-05	2005-06	Mean <i>Moyenne</i>
V1	4.48 ^b	3.37 ^b	4.23 ^a	5.96 ^b	4.51 ^b
DD1	9.03 ^c	12.28 ^c	11.72 ^c	11.72 ^c	10.29 ^c
Kanva 2	28.50 ^f	19.84 ^e	23.14 ^{de}	23.14 ^{de}	22.14 ^e
S54	22.97 ^e	16.06 ^d	21.35 ^d	21.35 ^d	19.68 ^d
S34	21.56 ^e	14.67 ^d	25.74 ^c	25.74 ^c	20.58 ^e
RFS 135	16.25 ^d	17.35 ^d	17.87 ^d	17.87 ^d	17.25 ^d
Palladam local	18.03 ^d	19.49 ^{de}	14.32 ^{cd}	14.32 ^{cd}	17.50 ^d
Kosen	14.14 ^d	15.09 ^d	19.32 ^d	19.32 ^d	16.63 ^d
S 365	20.00 ^{de}	14.35 ^d	26.42 ^e	26.42 ^e	20.62 ^e
S1	24.13 ^{ef}	22.98 ^e	24.32 ^c	23.16 ^c	23.65 ^e
MR 2	5.22 ^b	1.64 ^b	6.20 ^b	6.20	5.32 ^b
China white	0.00 ^a	0.57 ^a	1.24 ^a	1.24	0.77 ^a

In a column, means followed by same letter(s) are not significantly different by DMRT ($P = 0.05$) / Dans une colonne, les moyennes suivies par la / les même(s) lettre(s) ne sont pas significativement différentes d'après la DMRT ($P = 0.05$)

Mean data on PDI revealed that China white recorded the least incidence of 0.77 per cent followed by V1 (4.51 %) and MR2 (5.32). The next best variety was found to be DD1 (10.29 %). Among the genotypes, highest PDI was recorded on S1 (23.65%), S 365 (20.62 %), Kanva 2 (22.14 %) and S 34 (20.58%). Present finding corroborates with the findings of Lokya naik and Narasimharao, (1999) who reported the severity of the disease during the winter months on the varieties, S1 and Kanva 2.

The prevailing climatic conditions of rainfall, high humidity and optimum temperature during the winter months have favoured the development of disease in these varieties. Various genotypes and varieties of mulberry differ in their resistance to diseases (Sastry, 1984) and hence, screening of mulberry varieties will be much useful on further studies such as regional adaptability of evolved mulberry genotypes (Dandin, 1990). Present investigations revealed that the varieties, V1, MR 2 and DD 1 were most promising against powdery mildew.

Management of *P. corylea*:

The data obtained during winter 2004-05, winter 2005-06 and the pooled data are presented in Table II.

Winter, 2004-05:

Carbendazim 0.2 per cent recorded lesser PDI of 10.40 per cent which was found to be equal in its effectiveness with dinocap (12.17 %) at 20 days after spraying. Other treatments were significantly superior over control and were in turn par with each other.

Table II. Management of *Phyllactinia corylea* in mulberry.

Tableau II. Gestion de *Phyllactinia corylea* chez le mûrier.

Treatments (Conc. in %)	PDI (%)					
	Winter, 2004-05 <i>Hiver 2004-05</i>		Winter, 2005-06 <i>Hiver 2005-06</i>		Pooled mean <i>Moyenne regroupée</i>	
	10 DAS*	20 DAS	10 DAS	20 DAS	10 DAS	20 DAS
<i>Traitements (Conc. en %)</i>						
Chlorothalonil 0.2	27.12	17.32	28.46	19.09	27.79	18.21
Dinocap 0.2	22.03	12.17	24.19	14.73	23.11	13.45
Carbendazim 0.2	21.22	10.40	22.08	11.23	21.65	10.82
Wettable sulphur 0.2	24.10	16.32	25.42	15.44	24.76	15.88
<i>Soufre mouillable</i>						
Tridemorph 0.2	23.39	13.02	25.42	15.39	24.41	14.21
<i>Thuja orientalis</i>	25.13	18.13	26.40	17.61	25.77	17.87
Untreated control	37.07	39.42	39.97	43.52	38.12	41.47
<i>Témoin non traité</i>						
SED	1.35	1.29	1.62	1.41	1.58	1.43
CD (0.05)	2.90	2.78	3.21	2.92	3.10	2.96

* DAS - Days after spraying / Nbre de jours après la vaporisation.

Winter, 2005-06:

Lesser PDI of 11.23 per cent was recorded in carbendazim 0.2 per cent . The PDI ranged from 11.23 to 19.09 per cent in different treatments. Untreated control recorded 43.52 per cent PDI.

Pooled mean:

All the treatments recorded lesser PDI which ranged from 10.82 to 18.21 per cent against 41.47 per cent in untreated control . Among the various treatments, carbendazim 0.2 per cent recorded lesser PDI of 10.82 per cent. The next best treatments were dinocap (13.45%), wettable sulphur (15.88%) and tridemorph (14.21%). The botanical, *T. orientalis* recorded 17.87 percent against 41.47 in control.

Chemical control played a major role in reducing the powdery mildew infections and disease spread. The effectiveness of chlorothalonil and wettable sulphur for ornamental plants was reported earlier (Horticulture update, 2004). The effectiveness of wettable sulphur was proved by Gangwar *et al.* (2000). Reports are available on the efficacy of plant products such as parthenium and garlic (Vidyasagar and Rajasab, 2001) and *Cantaranthus roeus* (Pratheesh Kumar *et al.*, 2000) against *P. corylea* in mulberry. Our present findings on the efficacy of carbendazim confirm the results of Biswas *et al.* (1995).

REFERENCES

- BISWAS S.K., MANDAL R.S., TEOHA B.P., SENGUPTA K.(1995). Intensity of mulberry powdery mildew in west Bengal with some measures to control .Indian J. Seric., 24(2):114-117.
- DANDIN S.B (1999) Mulberry improvement programme for sustained productivity under tropics. In. Advances in Mulberry Sericulture. Devaiah M.C, Narayanaswamy K.C and Maribashetty U.G.(Eds).CVG Publishers. Bangalore,India.pp.51-87
- GANGWAR S.K., QUADRI S.M.H., MAJI P.M., PRATHEESH KUMAR., SARATCHANDRA B.(2000). Evaluation of fresh extracts on control of mulberry powdery mildew. Indian J.Seric., 39(1):76-78.
- HORTICULTURE UPDATE (2004) Powdery mildew on landscape ornamental plants. May 2004.
- LOKYANAIAK B.H., NARASIMHA RAO C.H.(1999) Incidence of foliar diseases among related new mulberry varieties under Malnad conditions. Proceedings of the National Seminar on Tropical Sericulture.CSR&TI, Mysore.28 -30, December. pp.87-89.
- PRADEESH KUMAR P.M., QUADRI S.M.H., MAJI M.D., GANGWAR S.K., SARATCHANDRA B.2000. Biological control of *P. corylea* (Pers) Kart using composted plant extract. J.Seric., 39(1): 81-83.
- SASTRY C.R (1984).Mulberry varieties, exploitation and pathology.Sericologia.24:333- 389.
- SHREE M.P. AND NATARAJAN S. (1993) Post infectional biochemical and physiological changes in mulberry. Curr.Sci.,65(4): 337-341.
- SULLIA S.B AND PADMA S.D.(1987). Acceptance of mildew affected mulberry leaves by silkworm (*Bombyx mori* L.)and its effect on cocoon characteristics. Sericologia., 27(4):693-696.
- VIDYASAGAR G.M AND RAJASAB A.H.(2001) Effect of neem (*Azadirachta indica* and parthenium (*Parthenium hysterophorus*) and garlic (*Allium sativum*) extracts on the incidence of powdery mildew caused by *Phyllactinia corylea*. Indian J. Seric., 40(1):87-85.

INTENSITE DE LA MALADIE DU MILDIOU POUDREUX PROVOQUEE PAR *PHYLLACTINIA CORYLEA* CHEZ LE MURIER ET MESURES DE LUTTE

S. MANIMEGALAI, N. CHANDRAMOHAN & C. A. MAHALINGAM

Department of Sericulture, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore – 641 003,
Tamil Nadu, Inde.

*L'intensité de la maladie du mildiou poudreux provoquée par *Phyllactinia corylea* chez différents génotypes de mûrier est comprise entre 0,77 et 22,14 %. China white enregistre l'incidence considérablement la moins importante (0,77 %), suivie par les variétés exploitées sur le plan commercial, V1 (4,51 %) et MR2 (5,32 %). Le fongicide carbendazim à 0,2 % est efficace contre *P. corylea* et donne un indice de la maladie (PDI) de 10,40 %, suivi par le dinocap à 0,2 % (13,43 %) alors qu'il est de 41,47 % chez le témoin non traité.*

INTRODUCTION

On considère que la maladie du mildiou poudreux du mûrier provoquée par *Phyllactinia corylea* (Pers) Karst. est grave pendant les mois d'hiver. La maladie entraîne une diminution considérable de la qualité (Shree et Natarajan, 1993) et de la quantité (Sullia et Padma, 1987) de feuilles. L'alimentation avec des feuilles de mûrier affectées par le mildiou diminue les caractères économiques chez le ver à soie du mûrier, *Bombyx mori* L. Il n'existe que quelques rapports sur la sévérité de la maladie et sur sa gestion surtout dans les conditions du Tamil Nadu. Nous avons donc essayé d'étudier l'incidence de la maladie chez les génotypes importants et chez les variétés de mûrier exploitées sur le plan commercial dans les conditions du Tamil Nadu afin de trouver des substances botaniques et des fongicides pour lutter contre la maladie.

MATERIELS ET METHODES

Pour étudier la sévérité de la maladie, on procède à des observations sur l'incidence de *P. corylea* chez les génotypes importants et chez les variétés exploitées sur le plan commercial dans la muraille maintenue au *Department of Sericulture*, de la *Tamil Nadu Agricultural University*, à Coimbatore. On enregistre le PDI pendant quatre années consécutives, c'est à dire en 2002-03 ; 2003-04 ; 2004-2005 et 2005-06 en novembre, décembre et janvier, mois pendant lesquels l'intensité est la plus élevée. Pour chaque génotype, on examine 25 plants à trois endroits différents pour estimer l'Indice de Pourcentage de la Maladie. On classe les feuilles infestées en fonction de l'intensité de la maladie.

Classement 1 = Pas de maladie, Classement 2 = 1 à 5 % de la surface de la feuille infestée, Classement 3 = 6 à 20 % de la surface de la feuille infestée, Classement 4 = 21 à 50 % de la surface de la feuille infestée, Classement 5 = plus de 51 % de la surface de la feuille infestée. On calcule l'Indice de Pourcentage de la Maladie en utilisant la formule :

$$\text{PDI} = \frac{\text{Somme de tous les indices (classements)}}{\text{Nombre total de feuilles} \times \text{indice maximum de la maladie}} \times 100$$

Pour déterminer l'efficacité des substances botaniques et des fongicides, on a réalisé deux expériences sur le terrain pendant l'hiver 2003-04 et pendant l'hiver 2005-06 avec la variété de mûrier Kanva 2 au mois de décembre. On réalise les expériences selon une conception aléatoire avec sept traitements répétés trois fois. Les traitements consistent en des concentrations de 0,2 % de chlorothalonil, de dinocap, de carbendazim, de soufre, de tridemorph et de *Tuja orientalis* avec un témoin non traité (vaporisation d'eau).

RESULTATS ET DISCUSSION

Intensité du mildiou poudreux :

Les observations sur plusieurs années montrent que le PDI enregistré est plus faible chez China white (sauf en 2004-05) suivi par V1 et MR 2. Ensuite, la meilleure variété est DD1 (Tableau I). Les données moyennes pour le PDI révèlent que China white enregistre l'incidence la moins importante de 0,77 % suivie par V1 (4,51 %) et MR2 (5,32). Puis, la meilleure variété est DD1 (10,29 %). Parmi les génotypes, on enregistre le PDI le plus élevé chez S1 (23,65 %), S 365 (20,62 %), Kanva 2 (22,14 %) et S34 (20,58 %). Ces résultats corroborent ceux de Lokya naik et Narasimharao, (1999) qui ont rapporté que la maladie est intense en hiver chez les variétés S1 et Kanva 2.

Les conditions climatiques qui dominent en hiver, c'est à dire les précipitations, l'humidité élevée et la température optimum favorisent le développement de la maladie chez ces variétés. Les divers génotypes et variétés diffèrent dans leur résistance aux maladies (Sastri, 1984) et il serait donc très utile d'évaluer les variétés de mûrier dans des études ultérieures sur, par exemple, l'adaptabilité régionale des génotypes de mûrier mis au point (Dandin, 1990). Notre étude montre que les variétés V1, MR2 et DD1 sont les plus prometteuses contre le mildiou poudreux.

Lutte contre *P. corylea* :

Les données obtenues pendant l'hiver 2004-05, l'hiver 2005-06 et les données regroupées sont présentées dans le Tableau II.

Hiver 2004-05 :

Le carbendazim à 0,2 % enregistre un PDI de 10,40 % qui est égal à l'efficacité du dinocap (12,17 %) 20 jours après la vaporisation. D'autres traitements sont significativement supérieurs au témoin et sont eux aussi égaux entre eux.

Hiver 2005-06 :

On enregistre un PDI minimum de 11,23 % avec le carbendazim à 0,2 %. Le PDI est compris entre 11,23 et 19,09 % avec les différents traitements. Le témoin non traité enregistre 43,52 % de PDI.

Moyenne regroupée :

Tous les traitements enregistrent un PDI minimum qui est compris entre 10,82 et 18,21 % contre 41,47 % chez le témoin non traité. Parmi les divers traitements, le carbendazim à 0,2 % enregistre le PDI le plus faible de 10,82 %. Ensuite, les meilleurs traitements sont le dinocap (13,45 %), le soufre mouillable (15,88 %) et le tridémorphe (14,21 %). La substance botanique *T. orientalis* obtient 17,87 % contre 41,47 % chez le témoin.

La lutte chimique joue un rôle principal pour diminuer les infestations par le mildiou poudreux et la propagation de la maladie. On a déjà rapporté l'efficacité du chlorothalonil et du soufre mouillable chez les plantes ornementales. (Horticulture Update, 2004). Gangwar et coll., (2000) ont prouvé l'efficacité du soufre mouillable. Il existe des rapports sur l'efficacité de produits à base de plantes tels que le parthenium et l'ail (Vidyasagar et Rajasab, 2001) et *Cantaranthus roeus* (Pratheesh Kumar et coll., 2000) contre *P. corylea* chez le mûrier. Nos conclusions sur le carbendazim confirment les résultats de Biswas et coll., (1995).

INFORMATION FOR CONTRIBUTORS

1) Papers should be in French or in English and be original contributions or reviews in the field of sericulture including silkworm, host plant, silk reeling, whatever the nature of studies (basic or applied) and topics (biochemistry, ecology, economy, virology, genetics, etc.).

2) Papers should be submitted to: **Dr G. CHAVANCY**. Submission of a paper to the Editor implies that it has not previously been published, that it is not under consideration for publication elsewhere and that, if accepted in *SERICOLOGIA*, it will not be published elsewhere in the same form without the written consent of the Editor.

3) Manuscripts and illustrations should be submitted in duplicate and the author should retain one copy. In the case of multiple ownership, the authors indicate who is to receive the proofs.

4) Manuscripts should be typewritten with double spacing and wide margin. Authors are requested to keep their communication as concise as possible. Footnotes should be avoided and italics should not be used for emphasis.

5) The typescript should contain the following features:

- Title followed by the author's name and full address.
- Abstract which should be a brief summary of the contents and conclusions of the paper and should refer to any new information. It should not exceed 200 words and may be divided into numbered sections.
- Keywords. A short list of keywords provided for rapid scanning of the contents of the paper and used for compiling the index.

- Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion should be given for papers presenting original results. For review, authors may choose the convenient presentation.

- Acknowledgements.

- References. The 'Harvard system' is to be followed. References should be detailed in the following order: author's names and initials, date (in parentheses), the title of the article, the name of the journal as abbreviated in the World List of Scientific Periodicals (4th edit., 1963), the volume and the first and last pages of the article.

For books, the author's names, date of publication, title, edition, number of pages, reference, publisher's name and the place of publication should be given.

In the text, references should be given as Dupont (1964) or (Dupont, 1964). When a citation includes more than two authors, e. g. Dupont, Durand and Martin, the paper should be cited in the text as Dupont *et al.*, provided this is not ambiguous. If papers by the same author(s) in the same year are cited they should be distinguished by the letters a, b, etc.

References to a paper "In press" means that it has been accepted for publication and given as follows:

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* In press.

6) Illustrations. All necessary illustrations should accompany the manuscript but should not be inserted in the text. All photographs, graphs and diagrams should be numbered consecutively in Arabic numerals in the order in which they are referred to in the text.

Glossy photographs or positive prints (not X-ray, negatives or slides) should be sent, unmounted wherever possible, and should be restricted to the minimum necessary.

Charts, graphs or diagrams should be drawn boldly in black ink on good quality white paper or card. Lettering to appear on the illustration should be given in full and should be of sufficient size to allow for considerable reduction where necessary.

Illustrations should not be larger than 14 × 19 cm. On the back of each illustration should be indicated the author's name, the figure number (in arabic numerals) and the top of illustration, when it is not clear.

Legends to figures should be typed on a separate sheet and not on the back of the original, and should give sufficient data to make the illustration comprehensible without reference to the text.

7) Tables. They should be numbered in roman numerals, typed on separate sheets and should have a title which will make the meaning clear without reference to the text. All tables and figures would be referred to in the text.

8) Only standard abbreviations should be used. Where specialized abbreviations are used, the name should firstly be given in full with the abbreviation indicated in parentheses.

9) The Latin names should be given for all species used in investigation.

10) Corrections to proofs should be restricted to printer's errors only. Other than these, substantial alterations will be charged to the author.

11) A reprint order form will be supplied with the proofs, and authors may order such reprints as they require when the proofs are returned. Please note that 25 free reprints are sent by the Editor.

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

1) Les articles présentés doivent concerner soit des travaux originaux, soit des synthèses. Ils doivent être rédigés en français ou en anglais. Ils doivent avoir trait à la sériciculture qui inclut les vers à soie, les plantes nourricières, la filature de la soie quelle que soit la nature des recherches (fondamentales ou appliquées) et des sujets (biochimie, écologie, économie, virologie, génétique, etc.).

2) Les articles doivent être soumis à : **Dr G. CHAVANCY**. Les articles soumis au Rédacteur doivent être inédits et ne doivent pas être présentés pour publication chez un autre éditeur. Les articles acceptés pour publication dans *SERICOLOGIA* ne pourront être publiés ailleurs sous la même forme sans le consentement écrit de l'éditeur.

3) Les manuscrits et illustrations doivent être soumis en double exemplaire, l'auteur conservant une copie. Dans le cas d'une co-rédaction, les auteurs doivent indiquer le nom de celui qui recevra les épreuves.

4) Les manuscrits doivent être dactylographiés avec un double interligne et des marges importantes. Les auteurs sont priés de rédiger des communications aussi concises que possible. Les renvois de bas de page sont à éviter et les caractères en italique ne doivent pas être utilisés pour la mise en relief.

5) L'article doit être présenté de la façon suivante:

- Le titre suivi du nom de l'auteur et de son adresse complète.
- Le résumé qui doit indiquer le contenu et les conclusions de l'article et doit faire référence à des informations nouvelles. Le résumé ne doit pas excéder 200 mots et peut être divisé en paragraphes numérotés.

- Les mots clés. Une petite liste de mots clés permettant une rapide analyse du contenu de l'article et utilisable pour la compilation de l'index.

- Les articles doivent être divisés en : Introduction, Matériel et Méthodes, Résultats et Discussion. Pour les articles de synthèse, les auteurs peuvent choisir la présentation qui leur convient.

- Remerciements.

- Références. Les auteurs doivent suivre le "Harvard system". Les références doivent être données dans l'ordre suivant : nom de l'auteur et ses initiales, date (entre parenthèses), titre de l'article, nom du journal tel qu'il est abrégé dans la liste mondiale des périodiques scientifiques (4ème édit. 1963), le volume et les première et dernières pages de l'article.

Pour les livres, il est nécessaire d'indiquer le nom de l'auteur et ses initiales, la date de publication, le titre, l'édition, le nombre de pages, le nom de l'éditeur et le lieu d'édition.

Dans le texte, les références doivent être indiquées sous la forme suivante : Dupont (1964) ou (Dupont, 1964). Lorsque la référence comprend plus de deux auteurs, par exemple Dupont, Durand et Martin, l'article doit être cité comme Dupont et coll. sauf si cela peut prêter à confusion. Si l'on cite des articles d'un même auteur publiés la même année, ils doivent être distingués par les lettres a, b, etc.

La référence à un article sous presse doit signifier que l'article a été accepté pour publication et elle doit s'écrire de la façon suivante :

SETOYAMA K. (1982) Effect of water on molecular motion of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* Sous presse.

6) Illustrations. Le manuscrit sera accompagné de toutes les illustrations nécessaires mais celles-ci ne doivent pas être insérées dans le texte. Toutes les photographies, graphiques et diagrammes doivent être numérotés consécutivement en chiffres arabes, dans l'ordre de citation du texte.

Les photographies sur papier brillant, ou les épreuves positives (pas de négatifs ou de diapositives) doivent être envoyées si possible sans montage et en nombre limité.

Les cartes, graphiques ou diagrammes doivent être dessinés nettement à l'encre noire sur le papier ou du carton blanc de bonne qualité. Les inscriptions apparaissant sur les illustrations doivent être complètes et de taille suffisante pour permettre une réduction importante si nécessaire.

Les illustrations ne doivent pas dépasser le format 14 x 19 cm. Au dos de chaque illustration doivent être indiqués le nom de l'auteur, le n° de la figure (en chiffres arabes) et l'orientation de l'illustration si nécessaire.

Les légendes des figures doivent être dactylographiées sur une feuille séparée et non pas au dos de l'original et elles doivent être suffisamment explicites pour éviter que l'on se reporte au texte.

7) Tableaux. Ils doivent être numérotés en chiffres romains et dactylographiés sur des feuilles séparées. Les titres doivent être suffisamment clairs sans qu'il soit nécessaire de se reporter au texte. Tous les tableaux et figures doivent être cités dans le texte.

8) Seules les abréviations normalisées sont autorisées. Lorsque des abréviations particulières sont utilisées, le nom devra d'abord être donné en entier suivi de l'abréviation entre parenthèses.

9) Le nom latin de toutes les espèces étudiées doit être indiqué.

10) Les corrections des épreuves doivent se limiter aux fautes de frappe. Toutes modifications importantes de l'article seront facturées à l'auteur.

11) Un bon de commande de tirés à part est fourni en même temps que les épreuves. Les auteurs peuvent ainsi commander des tirés à part en renvoyant les épreuves. Il est à noter que 25 tirés à part sont envoyés gratuitement par l'éditeur.

